UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NISINA EM MEIO
SINTÉTICO**

DANTE AUGUSTO MORAES

Tese para obtenção do grau de
Doutor

Orientadora

PROFa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo

2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NISINA EM MEIO
SINTÉTICO**

DANTE AUGUSTO MORAES

Tese para obtenção do grau de

Doutor

Orientadora

PROFa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo

2002

DANTE AUGUSTO MORAES

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NISINA EM MEIO SINTÉTICO

Dissertação para Obtenção de grau de DOUTOR

Comissão Julgadora

Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

1º Examinador

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

2º Examinador

Prof. Dr. Luiz Roberto Terron

3º Examinador

Profa. Dra. Maria Helena Santos Taqueda

4º Examinador

Profa. Dra. Mitsuko Taba Ohara

São Paulo, 19 de abril de 2002

"Muito melhor arriscar coisas grandiosas para alcançar triunfo e glória mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que não gozam e nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta na qual não conhecem derrota nem vitória."

Roosevelt

A minha mulher, Simone. – Luz da minha vida.

A minha adorada mãe.

Ao meu amado pai. (*in memoriam*)

*Desejo primeiro que você ame,
E que amando, também seja amado.
E que se não for, seja breve em esquecer.
E que esquecendo, não guarde mágoa.
Desejo, pois, que não seja assim,
Mas se for, saiba ser sem desesperar.*

*Desejo também que tenha amigos,
Que mesmo maus e inconstantes,
Sejam corajosos e fiéis,
E que em pelo menos num deles
Você possa confiar sem duvidar.
E porque a vida é assim,*

*Desejo ainda que você tenha inimigos.
Nem muitos, nem poucos,
Mas na medida exata para que, algumas vezes,
Você se interpele a respeito
De suas próprias certezas.
E que entre eles, haja pelo menos um que seja justo,
Para que você não se sinta demasiado seguro.*

*Desejo depois que você seja útil,
Mas não insubstituível.
E que nos maus momentos,
Quando não restar mais nada,
Essa utilidade seja suficiente para manter você de pé.*

*Desejo ainda que você seja tolerante,
Não com os que erram pouco, porque isso é fácil,
Mas com os que erram muito e irremediavelmente,
E que fazendo bom uso dessa tolerância,
Você sirva de exemplo aos outros.*

*Desejo que você, sendo jovem,
Não amadureça depressa demais,
E que sendo maduro, não insista em rejuvenescer
E que sendo velho, não se dedique ao desespero.
Porque cada idade tem o seu prazer e a sua dor e é
preciso deixar que eles escorram por entre nós.*

*Desejo por sinal que você seja triste,
Não o ano todo, mas apenas um dia.
Mas que nesse dia descubra
Que o riso diário é bom,
O riso habitual é insosso e o riso constante é insano.*

*Desejo que você descubra ,
Com o máximo de urgência,
Acima e a respeito de tudo, que existem oprimidos,
Injustiçados e infelizes, e que estão à sua volta.*

*Desejo ainda que você afague um gato,
Alimente um cuco e ouça o João-de-Barro
Erguer triunfante o seu canto matinal
Porque, assim, você se sentirá bem por nada.*

*Desejo também que você plante uma semente,
Por mais minúscula que seja,
E acompanhe o seu crescimento,
Para que você saiba de quantas
Muitas vidas é feita uma árvore.*

*Desejo, outrossim, que você tenha dinheiro,
Porque é preciso ser prático.
E que pelo menos uma vez por ano
Coloque um pouco dele na sua frente e diga "Isso é meu",
Só para que fique bem claro quem é o dono de quem.*

*Desejo também que nenhum de seus afetos morra,
Por ele e por você,
Mas que se morrer, você possa chorar
Sem se lamentar e sofrer sem se culpar.*

*Desejo por fim que você sendo homem,
Tenha uma boa mulher, que sendo mulher,
Tenha um bom homem
E que se amem hoje, amanhã e nos dias seguintes,
E quando estiverem exaustos e sorridentes,
Ainda haja amor para recomeçar.*

*E se tudo isso acontecer,
Não tenho mais nada a te desejar.*

Victor Hugo

AGRADECIMENTOS

- A Professora Thereza Christina Vessoni Penna, pela confiança, estímulo e amizade. Sem as quais esse trabalho seria impossível de se concretizar.
- Ao Prof. Eugênio Aquarone, um segundo pai para mim, que me auxiliou e me introduziu na vida acadêmica. Minha admiração e gratidão.
- Ao Prof. Dr. João Carlos, pela amizade de tantos anos e pelas orientações no laboratório e na vida.
- Ao Prof. Dr. Sunao Sato pela convivência, espírito crítico e ensinamentos.
- Ao Prof. Orlando Zancanaro Jr. Pela amizade e pelas idéias práticas.
- Ao Prof. Adalberto Pessoa Jr, pelo auxílio, apoio e idéias.
- A Prof. Maricê Nogueira de Oliveira pelo apoio, mesmo à distancia.
- A Prof. Maria Elena Taqueda, pelo auxílio na análise e planejamento estatístico.
- Aos Professores: Walter Borzani, Pitombo, Abrahão, Nacco, Colombo, Ferro, Leoberto, Cristina, Jamil, Wilson, Bona, Nicolau, Bety, Telma, Humberto, Minami, Suzana Lannes e Enny Fernandes. Meus mais sinceros agradecimentos.
- Aos funcionários colegas de Laboratório: Mauro, Kleber, Irene, Graça, Cândida, Ricardo, Gledson, Nilton, Dona Irene e Magno (*in memoriam*)
- Aos Pós-Graduandos, estagiários e amigos: Rachel, Luiz Dante, Gabriela, Carlota, Marcela, Eliane, Gledstone, Luiz, Fernanda, Marina, Eb Chiarini, Alzira, Marcelo, Cidinha e Virgílio. Meus agradecimentos.
- Aos meus alunos, sempre fonte de inspiração e alegria. (quando não do contrário)
- A amiga e colega Thelma Pavesi pela ajuda inestimável (e sua infinita fé).
- Ao Pessoal da Secretaria: Juarez, Miriam, Elza; e a tantos que me ajudaram, que não consigo me recordar agora, mas aos que serei eternamente grato.

RESUMO

Nisina, um antimicrobiano produzido por cepas de *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, pode ser utilizada como preservante em alimentos e, possivelmente, como agente antimicrobiano. Para aumentar sua produção por *Lactococcus lactis* ATCC 11454 em meio MRS (pH = 6,5) realizamos ensaios em agitador rotativo (100 rpm/ 30 °C/ 36h) a partir de 3 grupos de ensaios, designados por desenho fatorial de dois níveis ($2^{(4-1)}$ no grupo 01) e $2^{(3)}$ nos grupos 2 e 3. As concentrações de sacarose (2,2 a 15 g/L), asparagina (7,5 a 75 g/L), fosfato de potássio (6 a 18 g/L) e Tween 80 (1,0 a 6,6 g/L) foram adicionadas ao meio MRS (pH = 6,5). A produção de nisina foi acompanhada a partir do método de difusão em ágar a partir de utilização de *Lactobacillus sake* ATCC 9924 como microorganismo sensível. Os melhores níveis de nisina atingidos foram de $1,6 \times 10^4$ AU/mL (grupo 2) a $1,8 \times 10^4$ AU/mL (grupo 1) e obtidos para os níveis máximos de sacarose e asparagina. Dependendo das proporções entre as concentrações dos outros nutrientes, quando a concentração final de sacarose variou entre 0,33 g/L a 3,64 g/L, o pH oscilou entre 5,10 to 6,01, o ácido láctico produzido variou de 1,19 g/L a 4,44 g/L e a concentração celular variou de 0,99 a 4,184 mg/L. produção de nisina mostrou-se independente das velocidades de crescimento, as quais variaram de $0,0070 \text{ h}^{-1}$ a $0,0401 \text{ h}^{-1}$. A análise de regressão mostrou se adequar a um modelo polinomial quadrático: $\text{Log AU/mL} = 1,98905 - 0,213558 x_2 + 1,80028 x_3 - 1,40776 x_4 + 0,23436 x_1 x_2 + 0,35936 x_1 x_3 + 1,47217 x_3 x_4$ (equação principal). Onde os índices representam as concentrações de sacarose; asparagina; fosfato e tween 80 respectivamente. A análise de variância foi realizada para os parâmetros fixados para demonstrar a adequação do modelo proposto. (x são os índices dos nutrientes adicionados)

“ABSTRACT”

Nisin, an antimicrobial substance that is produced by *Lactococcus lactis*, can be utilized as a preservative and therapeutic agent. To improve its production by *Lactococcus lactis* ATCC 11454 in MRS broth (pH = 6.5), in rotatory shaker (100 rpm/ 30 °C/ 36h), three groups of assays, set up by a fractional factorial design of two-levels (2^{4-1} in group 01), and $2^{(3)}$ in groups 2 and 3 were carried out. The minimum and maximum concentrations of sucrose (5 to 12.5 g/L), asparagine (7.5 to 75 g/L), potassium phosphate (6 to 18 g/L) and Tween 80 (1.0 to 6.6 g/L) were added to the MRS broth (pH = 6.5). The nisin production was accompanied through the agar diffusion assay using *Lactobacillus sake* ATCC 9924 as a sensitive microorganism. The best nisin activities ranged from 1.67×10^4 AU/mL (group 2) to 1.84×10^4 AU/mL (group 1) and were obtained for maximum levels of sucrose and asparagine, depending of the proportions of the other nutrients concentrations, when the final sucrose content varied from 0.33 g/L to 3.64 g/L, the pH value oscillated between 5.10 to 6.01, the produced lactic acid was ranged from 1.19 g/L to 4.44 g/L and the dry-cell content was about 0.99 to 4,184 mg (DCW)/L. Nisin production was shown to be independent of growth rates, which ranged from 0.0070 h^{-1} to 0.0401 h^{-1} . The regression analysis attained a quadratic polynomial model: $\text{Log AU/mL} = 1.98905 - 0.213558 x_2 + 1.80028 x_3 - 1.40776 x_4 + 0.23436 x_1 x_2 + 0.35936 x_1 x_3 + 1.47217 x_3 x_4$ (main equation). The analysis of variance performed to the fitted parameters of the independent variables was performed for checking model fitting results adequacy. (x are the index for the nutrients added)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO:

COMISSÃO JULGADORA.....	ii
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO.....	viii
“ABSTRACT”	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
NOMENCLATURA, SIGLAS E ABREVIATURAS	xx

TESE:

1 – Introdução	1
1.1- Bacteriocinas	1
1.2- Classificação das bacteriocinas	2
1.3- O lantibiótico Nisina	3
1.4- Estrutura tridimensional da nisina.....	4
1.5- Propriedades físico-químicas da nisina	6
1.6- O mecanismo antimicrobiano da nisina	7

1.7- A síntese da nisina	9
1.8- Sistema gênico regulatório	10
1.9- Processo de fermentação.....	12
1.10- Dados cinéticos e de fermentação	14
2- Revisão da Literatura.....	19
3 - Objetivos.....	32
4 – Materiais e Métodos	33
4.1 - Cepas bacterianas, crescimento e meios	33
4.2 - Ensaio do planejamento experimental.....	34
4.3 - Preparo do Inóculo.....	35
4.4 - Métodos Analíticos	35
5 – Resultados e Discussão.....	46
5.1- Ensaio Iniciais.....	46
5.1.1 – Cultivos em MRS, sem adição de nutrientes.....	46
5.1.2 – Cultivos iniciais em MRS, com adição de sacarose.....	50
5.1.3 - Cultivos iniciais em MRS, com adição de asparagina....	52
5.2 - Grupos do Planejamento experimental.....	55
5.2.1 – Grupo 01 (ensaio 01-08); Grupo 02 (ensaio 09-24) Grupo 03 (ensaio 25-30).....	55
5.3 - Análise de regressão múltipla.....	58

5.4 - Influência dos fatores.....	65
5.5 - Dados da regressão múltipla.....	72
5.6 - Análise de variância do modelo.....	73
5.7 - Resultados da análise estatística.....	73
5.8 - Teste de Hipótese.....	75
5.9 - Proporções entre os nutrientes (fatores).....	91
5.10 - Resumindo os resultados, fatores e proporções.....	105
6 - Conclusões.....	108
7 - Referências Bibliográficas.....	109

ANEXOS:

Anexo 01 – Definições utilizadas.....	125
Anexo 02 – Dados experimentais e gráficos de processo	126
Ensaio Iniciais.....	126
Influência da sacarose.....	129
Influência da asparagina.....	131
Ensaio do grupo 01.....	133
Ensaio do grupo 02.....	141
Ensaio do grupo 03.....	157

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- Figura 01 – Estrutura secundária (seqüência de aminoácidos e dobramento) da Nisina Z.....	05
FIGURA 02- Figura 02 – Microrganismos utilizados: <i>Lactococcus Lactis subsp Lactis</i> e <i>Lactobacillus sake</i> ATCC 9221.....	34
FIGURA 03 – Equipamentos utilizados nos ensaios de crescimento:.....	38
FIGURA 04- Placas com meio MRS agar contendo o microrganismo sensível <i>Lactobacillus sake</i> , onde se avaliou a Potência de Nisina obtida pelo método de difusão em agar. (medida de halo de inibição).....	42
FIGURA 05- Dados de produtividade específica, pH e Produção de nisina para os ensaios sem adição de nutrientes.....	47
FIGURA 06- Correlação entre produção de nisina e concentração celular (mg/L) para os ensaios iniciais sem adição de nutrientes.	48

FIGURA 07- Variação de pH, produção de nisina e concentração celular para os ensaios iniciais com adição de sacarose 5,0 g/L..... 50

FIGURA 08- Produtividade específica, concentração celular e produção de nisina para os ensaios iniciais com adição de asparagina..... 53

FIGURA 09- Típico ensaio de crescimento do grupo Inicial, a partir dos valores de inclinação, crescimento e velocidades podemos comparar os parâmetros de processo e a inferência positiva ou negativa dos nutrientes testados nesta etapa.....54

FIGURA 10- Produtividades média e específica para os ensaios dos grupos planejados, verifica-se os máximos de produtividade para os ensaios 9, 11 e 19. Observa-se também correlação entre as duas produtividades o que indica produção ligada ao crescimento (metabolismo primário)..... 68

FIGURA 11- Gráfico relacionando LOG POT- valores observados (valores experimentais) em função de LOG POT – valores estimados (previstos pela análise de regressão)78

FIGURA 12- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 1.....85

FIGURA 13- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 2.....86

FIGURA 14- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 3.87

FIGURA 15- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 4.88

FIGURA 16- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 5.89

FIGURA 17- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 6.90

FIGURA 18- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 7.91

FIGURA 19- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 8.92.

FIGURA 20- Correlação positiva entre concentração celular (mg/L) e LOG POT ($\text{Log}_{10}\text{AU/mL}$) do lantibiótico nisina produzida em processo descontínuo.. 103

FIGURA 21- Avaliação da influência do proporção P/C e do pH final de processo e na produção de nisina expressa como Log POT.....104

FIGURA 22- Influência de nutrientes sacarose e fosfato adicionados ao caldo MRS para produção de nisina (dados dos ensaios do grupo 01)..... 105

LISTA DE TABELAS

TABELA 01- Nutrientes e fatores adicionados ao caldo MRS, suas inter- proporções e valores codificados para o planejamento (entre parêntesis) – Grupo 01.....	24
TABELA 02- Nutrientes e fatores adicionados ao caldo MRS, suas inter- proporções e valores codificados para o planejamento (entre parêntesis) – Grupo 02.	25
TABELA 03- Nutrientes e fatores adicionados ao caldo MRS, suas inter- proporções e valores codificados para o planejamento (entre parêntesis) – Grupo 03.	27
TABELA 04- Nutrientes e fatores adicionados ao caldo MRS utilizados na análise de regressão multiparamétrica em função do título de nisina obtido para cada ensaio. Agrupou-se os ensaios do planejamento do grupo 02 mais os ensaos de ponto central (com Tween 80 fixo em 1,0 g/L), mais 3 ensaios (9, 10 e 11) de codificação livre.....	58
TABELA 05- Valores codificados e valores reais utilizados na regressão múltipla.....	77
TABELA 06- Parâmetros de processo para grupo sem adição de nutrientes.....	79

TABELA 07- Parâmetros de processo para o grupo ASN (adição de: 0,02; 0,04 e 0,1 M) nos ensaios iniciais.....	80
TABELA 08- Parâmetros de processo para o grupo SAC (adição sacarose 5,0 g/L).....	81
TABELA 09- Parâmetros de processo para <i>Lactococcus lactis</i> (ensaios iniciais).....	82
TABELA 10- Resultados de processo para os 30 ensaios realizados, referentes aos grupos do planejamento.....	83
TABELA 11- Análises de regressão múltipla, equação 01 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais:.....	85
TABELA 12- Análises de regressão múltipla, equação 02 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais:.....	86
TABELA 13- Análises de regressão múltipla, equação 03 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais:.....	87
TABELA 14- Análises de regressão múltipla, equação 04 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais:.....	88
TABELA 15- Análises de regressão múltipla, equação 05 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais:.....	89

TABELA 16- Análises de regressão múltipla, equação 06 (ensaio 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais:.....90

TABELA 17- Análises de regressão múltipla, equação 07 (ensaio 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais:.....91

TABELA 18- Análises de regressão múltipla, equação 08 (ensaio 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais:..... 92

TABELA 19- Resultados de produção de nisina em função da adição de nutrientes nos grupos de planejamento experimental propostos.....100

TABELA 20- Resultados de produtividade, produção, produção específica e potência da nisina em ensaios iniciais com taxas de velocidade celular (μX) crescentes. 104

TABELA 21- Relações de nutrientes destacadas na tabela que, para o conjunto de proporções deduzidos dos dados da regressão e os dados experimentais, são relacionados aos pontos de máxima produtividade de nisina.....108

NOMENCLATURA, SIGLAS E ABREVIATURAS

- AcLat = Concentração de ácido láctico
- ANOVA = Análise de variância
- ART = Açúcares redutores totais
- ASN = Asparagina
- ASNc = Variável codificada - Asparagina
- ATP = Adenosina tri-fosfato
- AU/mg célula = Atividade específica em unidades arbitrárias de nisina produzida por mg de célula seca
- C= sacarose
- D = Taxa de diluição
- DHA = dehidroalanina
- DHB = 2,3 – dehidrobutirina
- Divisão Nacional de Alimentos (DINAL)
- DNA = Ácido desoxinucleico
- DW = Valor de Durbin-Watson
- E1, E2 ... En = I-ésimo ensaio experimental.
- EDTA =Ácido etileno diamínico tetra-acético

- Fc = Fator de correção
- FOS = Fosfato bibásico de potássio.
- FOSc = Variável codificada - Fosfato
- GL = Graus de Liberdade
- GRAS = Abreviatura em Inglês “generally regarded as safe”
- Kda = K Dalton, unidade de medida de massa molar, utilizada para proteínas e peptídeos.
- Lan = tioéter aminoácido (2S,6R) meso –lantionina
- Log Pot = Logaritmo (base 10) da potência de nisina.
- M = Concentração molar
- m/m = relação massa/massa
- m/v = relação massa/volume
- MAE = Media estatística.
- MeLan = metilantionina
- Nm = nanômetro, unidade de comprimento equivalente a 10^{-9} m
- OD = Sigla em Inglês “Optical density”
- P = fosfato
- P media = Produtividade média (AU/mL.h) – O quanto é produzido de nisina por hora durante o tempo total de crescimento)
- Pmedia = Produtividade média

- Prod = Produtividade (mg nisina / L.h)
- produção específica = mg nisina/ mg célula
- r = Coeficiente de correlação (Pearson)
- r^2 quadrado = Coeficiente de Determinação
- RMN = Ressonância nuclear magnética.
- RPM = Rotações por minuto
- SAC = Sacarose
- SACc = Variável codificada - Sacarose
- TWN = Tween 80
- UA = Unidades de absorvância.
- UI/mL = Unidades Internacionais de nisina por mililitro.
- UV/VIS = Ultra violeta ou Visível.
- Vc = Variável codificada
- X = Concentração celular final de processo (mg/L)
- x_1 = Variáveis independentes na análise de regressão – Sacarose codificada
- x_2 = Variáveis independentes na análise de regressão – Asparagina codificada
- x_3 = Variáveis independentes na análise de regressão – Fosfato codificado
- x_4 = Variáveis independentes na análise de regressão – Tween 80 codificado
- Y p/s = Fator de conversão Substrato em Produto
- Ys/p = Fator de conversão substrato em produto

- ϕ = Potencial proton-motivo.
- μ_X = velocidade específica de crescimento celular (calculados a partir da inclinação da curva Tempo x $\ln X$.)

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - BACTERIOCINAS

Codificados por genes, sintetizados ao nível de ribossomo, peptídeos antimicrobianos são largamente distribuídas na natureza. São utilizados para proteção contra microrganismos por mamíferos, pássaros, anfíbios, assim como entre microrganismos que os sintetizam. Bacteriocinas antimicrobianas são de natureza peptídica e estão associadas a importantes processos de proteção contra microrganismos invasores.

Antimicrobianos polipeptídicos produzidos por bactérias ácido-láticas podem estar associados com um tipo de defesa contra competidores que consomem um mesmo nutriente no mesmo ambiente. Estes compostos são geralmente denominados bacteriocinas, definidas como substâncias que inibem um grupo relativamente restrito de espécies bacterianas (Jack et. al , 1995). A denominação antibióticos não se aplica, pois estes não são sintetizados ribossomalmente.

Bacteriocinas produzidas por bactérias gram-negativas incluem as colicinas (produzidas por *E. coli*) e microcinas (produzidas por enterobacteriaceae). As colicinas são proteínas maiores do que 20 kDa, com exceção de colicina V (8,7 KDa), enquanto as microcinas são menores do que 10 kDa e são modificadas pos-translacionalmente.

Bactérias gram-positivas, em sua maioria, produzem bacteriocinas menores do que 6 kDa. Aquelas produzidas por bactérias ácido-láticas são divididas em três classes (Nes et al. 1996): i – Lantibióticos; ii – Lantibióticos pequenos não estáveis; e iii - Grandes proteínas lábeis ao calor.

1.2 - CLASSIFICAÇÃO DAS BACTERIOCINAS

O termo “lantibiótico” foi introduzido como abreviação para o tioéter aminoácido (2S,6R) meso –lantionina (Lan) e (2S,3S, 6R)- 3 – metilantionina (MeLan) – quando contidos na estrutura de antibióticos peptídicos (Schnell et al. 1988). Estes tipos de estruturas são exclusivamente encontrados e produzidos por bactérias gram-positivas: *bacilos*, *lactococos*, *lactobacilos*, *estafilococos*, *estreptococos* e *estreptomicetos*. Além do mais, vários outros resíduos de aminoácidos modificados têm sido encontrados em lantibióticos: 2,3 –dehidroalanina (DHA), 2,3 – dehidrobutirina (DHB), eritro- 3-hidroxi-L ácido aspártico, S-(Z)- aminovinil-D-cisteína, (2S,8S) – lisinoalanina, D-alanina, 2- oxopropionil, 2 oxobutiril, valina-amida e N-alfa-succinil-triptofano (Kupke e Gotz, 1996).

Os dois maiores subgrupos foram classificados por Jung (1991) como: Tipo A – são lantibióticos de formato fusiforme, anfipáticos apresentando cargas positivas.

Lantibióticos tipo B são mais globulares e sem carga. Lantibióticos tipo A incluem a nisina A , nisina Z, subtilisina, epidermina, galidermina, lactocinina 481, salivaricina A, citolisina LL e citolisina LS

Todos esses compostos são sintetizados com extensão N-terminal que não está em conformidade com o sinal seqüencial genético de consenso. Os lantibióticos lineares (tipo A) foram posteriormente classificados em dois outros grupos baseados no tamanho, carga efetiva e aminoácidos conservados. (De Vos et al., 1985); a classe AI inclui moléculas com carga ligeiramente positiva ou negativa, um seção conservada de seis aminoácidos e um resíduo prolina na posição dois. A classe AII os lantibióticos são geralmente carregados negativamente e contem a seqüência GA.GS.GG precedendo imediatamente o sítio de clivagem. A seqüência líder de lactocina S não encaixa bem em nenhuma destas classificações, permanecendo isolada.

1.3 - O LANTIBIÓTICO NISINA

A nisina tem sido utilizada em conservação de alimentos por mais de 50 anos, inicialmente isolada por Mattick e Hirsh (1944), que concentraram uma substância inibitória contra várias bactérias e isolada também por Meanwell (1943).

Devido ao aumento na demanda por alimentos mais puros e seguros, conseqüentemente com menos aditivos químicos, existe procura constante por encontrar novos inibidores de crescimentos de microrganismos indesejáveis e perigosos tais como

Clostridium botulinum e outros. Um dos mais promissores e importantes grupos de inibidores naturais são as bacteriocinas. Recentemente verificou-se grande possibilidade de uso de nisina para finalidades terapêuticas, sendo particularmente interessante em tratamentos de úlceras estomacais e infecções de cólon intestinal para pacientes com imunodeficiência.

A nisina foi inicialmente nomeada desta forma em função do termo “Group N Inhibitory Substance” produzida por estreptococos de Lancefield – Grupo sorológico N ou gênero estreptococos (Mattick e Hirsh, 1947). O peptídeo nisina foi inicialmente descrito por Gross e Morell (1971), e sua estrutura de DNA foi originalmente identificada por Buchman et. al. (1988).

Existem duas variantes naturais de nisina: nisina A e nisina Z, as quais diferem em apenas um simples aminoácido na posição 27. A asparagina na nisina Z é substituída por histidina na nisina A (Graeffe et al. 1991; de Vos et al. 1991). A substituição do aminoácido é devida à troca de um simples par de bases para o códon correspondente. As diferenças entre as variantes de nisina são pequenas, a nisina Z parece ser ligeiramente mais difusível em ágar e mais solúvel em pH neutro (Mulders et al. 1991)

1.4 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA NISINA

A proteína consiste de dois domínios: i- Um domínio N-terminal, resíduos 3-19 contendo 3 anéis lantionina chamados anéis A, B e C; ii – Um domínio C- terminal, resíduos 22-28, contendo dois anéis interligados denominados D e E. A orientação dos anéis A, B e C assim como D e E foi determinada na presença de membrana micelar por RMN (ressonância magnética nuclear) (van de Ven , 1991)

Figura 1 – Estrutura secundária (seqüência de aminoácidos e dobramento) da Nisina Z. Observa-se a presença de pontes dissulfeto que conferem rigidez à molécula assim como resistência à baixo pH e termoestabilidade; assim como a presença dos aminoácidos pouco comuns ABA; DHA e DHB.

1.5 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA NISINA

A nisina é um lantibiótico tipo A, produzido por algumas cepas de *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, sua estrutura química foi descrita originalmente há 30 anos (Gross e Morell, 1971). Quando o gene estrutural *nisA* foi seqüenciado, (Buchman et al. 1988) verificou-se que o mesmo codifica uma longa pré-proteína de 57 aminoácidos, a qual contém 23 resíduos na seqüência líder. Os aminoácidos não usuais DHA, DHB, LAN e MeLAN encontrados na proteína madura são derivados de resíduos de serina e treonina, decorrentes de modificação pós-translacional envolvendo a desidratação da serina e treonina para DHA e DHB, respectivamente. Na reação do grupo sulfidrila da cadeia lateral das cisteínas, os aminoácidos DHA e DHB formam estruturas de tioéter LAN e MeLAN (Buchman, 1988) estruturando a cadeia pentacíclica do lantibiótico. O termo nisina designa a forma madura e ativa da bacteriocina após a mudança química pós-translacional.

A massa molar da nisina na sua forma madura e monomérica (anel pentacíclico), é de 3353 Da, apresenta elevada solubilidade em meio aquoso em pH 2,0 a qual decai muito com o aumento de pH, atingindo insolubilidade em pH 8,5 – 11 podendo formar oligômeros (Liu e Hansen, 1990). Sua elevada estabilidade química em pHs baixos tornam a nisina um antibiótico de grande interesse.

1.6 - MECANISMO ANTIMICROBIANO DA NISINA

A nisina apresenta espectro de ação contra ampla gama de microrganismos gram-positivos incluindo: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Listeria* e *Mycobacterium* (Sahl et al.; 1995). Esporos de bacilos na forma gram-positiva tais como de *Bacillus* e *Clostridium* sp. são particularmente susceptíveis à nisina (Delves-Broughton et al. 1996). Especialmente importante é a ação inibitória contra formas comuns em contaminação por patógenos, tais como *Listeria monocytogenes* (Benkerroum e Sandine, 1988) e *Clostridium botulinum* (Sommers e Taylor, 1987), em alimentos. A eficácia do agente nisina contra isolados de bactérias hospitalares resistentes à muitas outras drogas tais como *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* foi testada. Na maioria dos casos os patógenos mostraram-se sensíveis ao tratamento com nisina (Severina et.al. 1988).

Os primeiros dados sobre efeito inibitório da nisina contra muitas bactérias Gram-negativas foram para *Salmonella typhimurium*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em combinação com agentes quelantes (Blackburn et al. 1990), especialmente EDTA (20 mM) em combinação com 50 µg de nisina/mL mostraram-se eficientes (Stevens et al. 1991).

As novas técnicas de tratamento não térmico de alimentos contribuíram para o grande avanço no estudo da utilização da nisina como conservante nesta área, com amplas vantagens sobre os conservantes artificiais principalmente no que tange à segurança toxicológica.

Bacteriocinas oriundas de bactérias de natureza Gram-negativas agem de maneira muito restrita como inibidor de outras espécies, por outro lado as provenientes de bactérias ácido lácticas e bactérias Gram-positivas geralmente são eficazes contra uma larga faixa de outras bactérias Gram-positivas. Algumas bacteriocinas, tais como duramicinas, ancovenina e cinamicina, agem como inibidores enzimáticos, e pertencem à classe de lantibióticos I tipo B.

No entanto, o mecanismo de ação principal da nisina é ligado à formação de poros na membrana bacteriana. A formação dos poros aumenta a permeabilidade da membrana à íons de maneira descontrolada, levando à perda de ATP e aminoácidos, os quais, levam à perda ou dissipação do potencial de membrana da bactéria. O efeito combinado de depleção de energia e efluxo de compostos essenciais comprometem a síntese de macromoléculas e resulta finalmente na morte celular, acompanhada em muitos dos casos por lise celular. Entre os formadores de poros conhecidos estão: nisina, Pep5, epidermina e lactocina A e B.

A ação da nisina contra esporos é causada pela ligação de resíduos de proteína com grupamento sulfidrílicos (Morris et al. 1984). Existem outras abordagens de mecanismo de ação da nisina contra esporos e células vegetativas. A sensibilidade de esporos à nisina varia de acordo com as espécies, tais como *Bacillus stearothermophilus* e *Clostridium thermosaccharolyticum*, sendo particularmente susceptíveis quando todos os esporos abrem suas camadas externas por ruptura mecânica (Gould e Hurst, 1962). De maneira semelhante, os esporos podem ser sensibilizados pela nisina através de tratamento com ácido etileno diamínico tetra acético (EDTA) (Fowler e Gasson, 1991). O efeito da nisina nas células alvo é exercido na membrana celular.

A nisina causa primordialmente a formação de poros seguida da perda do potencial elétrico de íons negativos, resultando na dissipação da força próton-motiva (Ruhr e Sahl, 1985; Kordel e Sahl, 1986).

1.7 - A SÍNTESE DE NISINA

Baseado na comparação de seqüências de aminoácidos, acredita-se que os genes *nisR* e *nisK* são membros de uma grande família de sistemas de regulação: sensores ambientais e da síntese da pré-proteína (Stock et al. 1989). Deste modo, *nisK* está ligada à proteína de membrana histidina-quinase e *nisR* é um regulador

citoplasmático transcripcional de resposta à síntese. Neste sistema, como resultado da estimulação, a histidina quinase é autofosforilada mantendo um resíduo de histidina, o que permite a fosforilação de um resíduo de asparagina, que irá interagir com o gene alvo. Não existem estudos detalhados sobre proteínas de resposta ligadas a DNA com aspectos de regulação da síntese das bacteriocinas (Nes et. Al., 1996). Muito embora, deleções às correspondentes proteínas de LanR e LanK em nisina inativaram os seus respectivos operadores gênicos.

A nisina é sintetizada ribossomalmente e este peptídeo é amplamente distribuído na natureza. Bacteriocinas atuam como proteção contra micróbios por mamíferos, pássaros, anfíbios, insetos e plantas além de microrganismos (Hansen, 1993; Nissen-Meyer, 1997). Entre os mamíferos a atividade antimicrobiana de peptídeos são tidas como uma entre várias atividades endógenas, por exemplo, as de analgesia (endorfinas) e imunidade (anticorpos) tendo portanto, importantes atividades biológicas inatas de natureza evolutiva.

1.8 - SISTEMA GÊNICO REGULATÓRIO

Uma série de vetores contendo o sítio de regulação para a fase transcripcional e translacional são associados ao gene PnisA. Genes inseridos sob PnisA neste vetor são altamente induzíveis com baixos níveis de nisina no meio externo. Isto é um indício de

que outros componentes da rota biossintética da nisina não são requeridos para sua indução. O sistema NisRK de regulação oferece uma possibilidade de regular a expressão de proteínas heterólogas de *L. Lactis*. O indutor sacarose, sendo uma substância alimentar, pode ser diretamente adicionado às fermentações lácteas.

O transposons conjugativos nisina-sacarose são elementos auto transmissíveis no genoma bacteriano e são expressos somente durante a transferência por conjugação. (Salyers e Shoemaker, 1995). Muitos destes elementos carregam informação que codificam expressão de resistência a antibióticos e de imunidade à nisina à célula produtora.

Os genes que codificam a fermentação de sacarose em todas cepas produtoras de nisina foram caracterizados e são de caráter móvel (*transposons*). E estes genes são dispostos em duas seqüências indizíveis de operons com orientação recíproca (Thompson et al. 1991).

Aspectos de regulação do sistema de produção de nisina são de particular interesse, uma vez que os reguladores podem ser utilizadas na otimização do meio de cultivo para aumento da produção de nisina. Conhecimento mais aprofundado dos mecanismos de regulação estão disponíveis na literatura especializada e servem como diretrizes para novas propostas de controle de processo nos complexos eventos bioquímicos envolvidos na síntese da nisina.

1.9 - PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis subsp. lactis*, principalmente durante a fase exponencial de crescimento (Buchman et al., 1988). O lançamento de nisina da célula no meio de propagação é dependente do pH deste ambiente (Hurst e Kruse, 1972). Em valores de pH menores que 6,0 mais de 80% da nisina produzida é liberada para o meio de crescimento. Enquanto para pH > 6,0 a maior parte da nisina está associada à membrana celular e no interior da célula. Além disso, um atraso da fase de crescimento rende um expressivo aumento em produção de nisina.

Estudos prévios mostraram que a nisina é formada continuamente desde os estágios iniciais de crescimento até a fase estacionária, (Buchman et al. 1988; De Vuyst e Vandamme, 1992). No entanto, não é conhecida a atividade transcripcional de outros genes da nisina durante outras fases de crescimento. Existem evidências que confirmam que os genes estruturais são expressos durante todas etapas de estado vegetativo incluindo o do gene promotor.

A sacarose, um dissacarídeo, é rapidamente utilizada para produção de nisina por *L. lactis*, provavelmente porque possui um sistema enzimático muito eficiente: (i) fosfotransferase fosfoenolpiruvato-dependente para o consumo da fonte de carbono, transporte e metabolismo (Thompson, 1990); (ii) sacarose 6-fosfato hidrolase, (iii) frutoquinase I (Thompson, et. al. 1991). Geralmente, concentrações iniciais maiores

provocam aumento na produção de nisina no fim da fase exponencial e decréscimo em título de nisina durante prolongada fermentação. Existe evidência de uma ligação entre fermentação de sacarose e capacidade de síntese de nisina (De Vuyst, 1990).

Elli et al. (1999) estudaram a influência de fatores de crescimento na fermentação de bacteriocinas por *Lactococcus johnsonii* em leite e detectaram que, geralmente, leite e meios naturais são carentes de conteúdo de aminoácidos e outros nutrientes. O crescimento bacteriano pode ser aumentado nestes casos pela adição de substâncias de composição indefinida ao meio, tais como extrato de levedura e peptonas de várias origens (Cocaign-Bousquet & Linley, 1996) ou pela adição de aminoácidos específicos, incluindo metionina, prolina e asparagina. Em processo de fermentação tipo descontínuo com sacarose, utilizando *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 para produzir dextrano-sacarase, houve um decréscimo na velocidade de formação de produto com o decréscimo de nitrogênio, na relação extrato de levedura/carbono (sacarose). Muitas vezes, aspectos de regulação da produção de metabólitos primários são ligados ao balanço de nutrientes.

A asparagina tem participação na estrutura de aminoácidos da nisina; sua carência pode diminuir o rendimento de produção do antibiótico e sua adição foi proposta, neste trabalho, como constituinte de meio de cultivo otimizado.

A ação do polissorbato 80 (Tween 80) está ligada ao fenômeno de dispersão da nisina da membrana para o meio de cultivo. Apesar de adicionado em pequenas quantidades, seu efeito pode ser importante, não como nutriente, mas como agente que ajudaria a liberar a nisina de fenômenos de adsorção junto à membrana citoplasmática.

O abaixamento do valor de pH para 4,0 é um fator limitante de crescimento entretanto, para valores de pH no intervalo entre 5 e 6 favorece o crescimento, seguido de uma fase estacionária relativamente longa. O efeito do abaixamento do valor de pH no crescimento celular é parcialmente devido à concentração de formas dissociadas e não dissociadas de ácido láctico no caldo (Fu e Matthews, 1999).

A presença de fosfato bibásico de potássio foi sugerido como essencial na formulação do meio para obtenção de elevadas concentrações de nisina devido às suas propriedades como agente tamponante, assim também como fonte de íons fosfato e potássio, os quais são necessários para o desenvolvimento celular. De Vuyst e Vandamme, (1992) – formularam um meio complexo contendo: sacarose (1%), peptona (1%), extrato de levedura (1,0%), dihidrogeno fosfato de potássio (1%), cloreto de sódio (0,2%) e sulfato de magnésio (0,02%). Estes autores obtiveram concentrações de nisina na ordem de 2000 UI/mL.

1.10 DADOS CINÉTICOS E FERMENTAÇÃO

O acompanhamento de vários parâmetros cinéticos são de utilidade para compreensão e mensuração do processo. Em nosso estudo fizemos acompanhamento dos parâmetros a seguir:

1	Células, X	Biomassa ao final de processo (mg/L)
2	AU/mL	Unidades Arbitrárias de Nisina obtida
3	Prod	Produtividade (mg nisina / L.h)
4	μX	Velocidade específica de crescimento (h ⁻¹)
5	AU/mg células	Unidades arbitrárias de Nisina obtida por mg de células
6	$Y_{p/s}$	Fator de conversão Substrato em Produto
7	produção específica	mg nisina/ mg célula
8	$\mu_{máx}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular

Devido à produção de nisina tratar-se de processo de metabolismo primário, torna-se muito importante conhecer o comportamento do crescimento de biomassa uma vez que o título de nisina tende a se comportar paralelo ao seu desenvolvimento (produção associada ao crescimento celular). De maneira geral, isto ocorreu para a série de 36 experimentos do trabalho. A correlação positiva entre título de nisina e produção de biomassa será melhor discutida no capítulo de Resultados e Discussão deste trabalho.

A concentração de nisina em unidades arbitrárias foi utilizada em função do método de avaliação da concentração de nisina por processo de difusão em ágar. A maior vantagem deste método é sua natureza biológica, que mede a atividade da bacteriocina em termos biológicos e não por um método físico ou químico. Mede, portanto, a atividade real de ação antibiótica do peptídeo. Em métodos químicos, muitas vezes, as medidas de concentração de nisina podem detectar massas elevadas de bacteriocina, porém sem relacionar com sua atividade efetiva.

A desvantagem principal do método é ligada ao fato de fornecerem valores arbitrários de potência, de caráter relativo e comparativo, não absolutos. Em trabalhos de otimização, o que pode ser de elevado valor, pois Unidades Arbitrárias/mL (AU/mL) servem de parâmetro na comparação da produção entre as diversas condições de nutrientes testadas.

A produtividade, em termos de quantidade de nisina formada por tempo de processo, é parâmetro fundamental em cinética de processos fermentativos. Em análise econômica, a produção é sempre ponderada com o tempo de processo para fins de cálculo de custos, número econômico de dornas, tempo ótimo de processo, e outros. Além do mais, a produtividade é uma medida direta da produtividade média (dX/dt) do processo. A relação dX/dt é um dado importante se realizarmos balanço de massa para um processo, com vistas à sua otimização.

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) é, talvez, o dado cinético mais importante de crescimento em processos fermentativos, mede a velocidade de multiplicação em sua taxa máxima, ponderada pela quantidade de células que levam a essa transformação. O valor de dx/dt deve ser analisado e comparado com certo cuidado; por exemplo, um mesmo valor de $\mu_{\max}$ elevado pode ser ligado a uma mesma velocidade instantânea de crescimento (dado obtido pelo cálculo da inclinação da reta tangente à curva de crescimento). No entanto, esta velocidade pode ser fornecida por quantidades diferentes de células. O valor de $\mu_{\max}$ elevado, quando obtidos em concentrações celulares elevadas, não é tão interessante quanto $\mu_{\max}$ elevados quando produzidos por quantidades menores de células. Ou seja, uma quantidade menor de células multiplica-se com eficiência muito maior para equilibrar os valores daquela outra condição. Tal situação é ideal, pois leva a um crescimento em que a produtividade em células será máxima, que, ponderada com uma quantidade de células realmente necessárias à transformação, leva a um grande aumento de eficiência de processo.

Além disso, μX é de elevada utilidade em produção em sistema contínuo. Neste sistema de produção, almeja-se produzir nisina em velocidade máxima e constante. Assim o ideal, é se obter uma condição de processo em que $\mu X = D$, onde D é a vazão específica, ou taxa de diluição específica da dorna onde ocorre a produção.

Ponderar a quantidade de nisina produzida em função da quantidade de células (AU/ mg de células) fazendo a transformação é uma maneira de indicar uma condição de atividade específica ideal.

O fator de conversão $Y_{p/s}$ mede a quantidade de substrato que é convertida em massa de produto no metabolismo primário. No nosso caso, o substrato é a sacarose (ou glicose) e o produto é o ácido láctico (a nisina está ligada ao metabolismo primário). Fatores de conversão nem sempre indicam claramente fenômenos paralelos como os abordados pelo nosso trabalho (produção de ácido láctico, por exemplo). Servem meramente para indicar o quanto de substrato foi efetivamente utilizado no processo ou apresenta-se em quantidades sub ou superestimadas na composição do meio.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente existe um grande interesse tecnológico para utilização industrial de nisina como conservante de alimentos, uma vez que a demanda maior dos novos mercados consumidores é por alimentos considerados naturais, sem conservantes artificiais e com baixa ou nenhuma toxicidade.

Como a nisina é uma proteína naturalmente sintetizada a partir de cepas de bactérias ácido-láticas, cresce o seu interesse por assegurar os alimentos refrigerados minimamente processados. Devido à sua termoresistência, a nisina pode ser utilizada em adição aos tratamentos térmicos de alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$) para a preservação do produto, evitando a deteriorização, geralmente causadas por bactérias termófilas, formadoras de esporos, permitindo dessa forma uma redução na severidade do tratamento térmico, garantindo a qualidade organoléptica e nutricional do produto.

A nisina possui amplo espectro de atividade contra bactérias gram positivas. São sensíveis à nisina os gêneros *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* e *Mycobacterium*. Agem também contra bactérias Gram negativas tais como as *Salmonellas*, quando tratadas previamente com EDTA ou injuriadas fisicamente por sonicação.

Bacteriocinas produzidas por bactérias ácidas lácticas, tais como nisina, têm

freqüentemente sido associadas com o termo – antibiótico. O termo antibiótico de fato define um antagonismo contra outros microrganismos mas que não pode ser atribuído para bacteriocinas (Klaenhammer, 1992). O termo mais apropriado portanto é agente antimicrobiano ou conservante.

Bacteriocinas são sintetizadas como metabólitos primários, e podem sofrer modificações pós-translacionais. Os seus determinantes genéticos são codificados por plasmídios. Podem ser proteínas simples, porém alguns tipos podem ser moléculas complexas contendo lipídios e componentes de carboidrato (Liu e Hansen, 1990). Estas proteínas, compostas de peptídeos de caráter hidrofóbico, freqüentemente contém aminoácidos incomuns que têm propriedades antimicrobianas, tais como a lantionina (alanina-S-alanina). Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas variam bastante no seu espectro de atividade. Muitos destes compostos peptídicos, ficam estáveis durante vários meses de refrigeração e congelamento, secas ou liofilizadas, e permanecem biologicamente ativas em condições de pH ácidas (de Vuyst e Vandamme, 1992). São suscetíveis a digestão de enzimas proteolíticas que não incluem as do trato gástrico humano, a perda maior de atividade biológica ocorre com as enzimas proteolíticas do trato intestinal. Com exceção de algumas bacteriocinas, a maioria é estável ao calor e assim são satisfatórias para inclusão em produtos alimentares que requerem processo térmico. A estabilidade ao calor deste peptídeos é associada com o tamanho pequeno relativo e sua natureza hidrofóbica. Outro fator físico-químico que

atua na atividade da nisina é o pH do meio. O pH ótimo para atividade é pH de 6,5 (Hurst e Kruse, 1972).

É consenso que o mecanismo de ação da nisina se deva à ligação de resíduos de proteínas receptoras na membrana das células, que se ligam a grupos sulfidrilas da estrutura da nisina (Morris et al. 1984). Isto é indicativo da diferente natureza de ação da nisina em células vegetativas e em células na forma esporulada. De fato, Hansen et al. (1991) descreveram mecanismos diferentes de ação, uma vez que a forma esporulada os receptores de membrana não se apresentam tão facilmente devido à presença da camada de esporulação. Nestas circunstâncias, bactérias podem tornarem-se sensíveis por ação de calor ou por sonicação (Fowler e Gasson, 1991).

A formação de poros parece ser o mecanismo mais aceito, pois a ação da bacteriocina na membrana citoplasmática gera um efluxo descontrolado de íons, aminoácidos e ATP, desestabilizando o potencial próton-motivo ($\Delta\phi$) da membrana e provocando morte celular (Ruhr & Sahl (1985) e Kordel & Sahl (1986), confirmados mais recentemente por Palmieri et al. (1996), Carmen et al. (1997) e Abee et al. (1995).

Devido à sua elevada segurança toxicológica a nisina foi confirmada como GRAS (“generally regarded as safe”) e de uso liberado como aditivo alimentar pelo Comitee do Codex alimentarius, da FAO, para uso como agente antimicrobiano de

esporos e formação de toxinas por *Clostridium botulinum* em queijos fundidos e pasteurizados. Sendo que a sua utilização foi aprovada em 47 países, incluindo os seguintes produtos: queijos, queijos processados, vegetais, frutas enlatadas, cremes de confeitaria, leite, produtos lácteos, pudins, carnes processadas, embutidos, produtos de padaria e maionese.

A nisina apresenta-se bastante termoestável durante processos térmicos de esterilização. No entanto, Davies et al. (1998) verificaram que o pH pode alterar razoavelmente a atividade residual da nisina após o aquecimento. Portanto devem ser adotados cuidados ao se esterilizar alimentos com pH abaixo de 3,0 para evitar a perda da atividade da nisina como conservante no alimento.

No Brasil, a nisina foi aprovada pela Divisão Nacional de Alimentos (DINAL) do Ministério da Saúde (Portaria Nº. 06; 1987) para ser utilizada em preparados à base de queijos fundidos, numa quantidade máxima de 12,5 mg/Kg.

Segundo Montville (1994), as bacteriocinas, que incluem a nisina, são compostos peptídicos, com atividade biológica antimicrobiana contra espécies intimamente ligadas ao microrganismo que as sintetiza. São compostos produzidos por bactérias ácido-láticas, de tamanho variável entre 30 a 60 resíduos de aminoácidos, com caráter anfipático e que variam muito na forma e em propriedades bioquímicas (Verheul, 1997).

A nisina apresenta-se como a bacteriocina melhor caracterizada atualmente. Sua produção é praticamente toda obtida de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, de maneira que o grande apelo comercial representado por essa nova classe de antimicrobianos e conservante alimentar provocou diversas abordagens tecnológicas de produção desta substância.

Esta pequena revisão deteve-se, predominantemente, em algumas dessas técnicas de produção de bacteriocina, com interesse claramente tecnológico de sua utilização. Existem descrições de varias substâncias diferentes produzidas por *Lactococcus lactis*.

A atividade antimicrobiana é conhecida desde 1928, quando Rogers et al. (1928) descreveu uma substância de natureza antibiótica extraída de *Lactococcus lactis*. Este relato tem interesse histórico pois precedeu em um ano a descrição de Flemming do antibiótico penicilina.

Whitehead et al. (1933) foi o primeiro autor de fato, a isolar quimicamente a primeira bacteriocina produzida por *Lactococcus*, seguido por Meanwell (1943), Mattick e Hirsch (1947), Gowans (1952), Kozak (1978) e outros. Tais substâncias de natureza protéica foram descritas na primeira metade do século passado. No entanto, a nisina foi descrita inicialmente por Mattick e Hirsch em 1947, sendo a bacteriocina de aplicação industrial mais desenvolvida.

Devido à produção de nisina parecer ser dependente do crescimento e atividade fisiológica do microrganismo, a quantidade de bacteriocina produzida apresenta correlação com a quantidade de biomassa produzida. A maior parte dos outros antibióticos apresenta-se como metabólitos secundários, os quais são sintetizados durante a fase estacionária de crescimento. Segundo De Vuyst e Vandamme (1992) a produção de bacteriocinas é ligada ao metabolismo primário e depende principalmente de fatores nutricionais do meio de cultivo e da temperatura de fermentação. Conseqüentemente, a composição do meio de cultivo se apresenta como sendo de fundamental importância na otimização da produção. A maior parte das bacteriocinas são otimamente produzidas a partir de meios complexos (Hurst, 1981; Rayman, 1984; De Vuyst, 1992) e à temperatura de crescimento de 30°C. De Vuyst & Vandamme, (1994) determinaram a importância da fonte de carbono na produção de nisina por *Lactococcus lactis* em processo de fermentação do tipo descontínuo. De extrema importância foi a análise de expressão do gene pré-nisina (nisA) que aparentemente se mostrava ligado à regulação em função da fonte de carbono, no caso sacarose.

De Vuyst et al. (1994) determinaram um meio mínimo sintético, denominado SM8, para síntese de nisina composto de 8 aminoácidos, 5 vitaminas e sais inorgânicos, como objeto de estudo e comparação, concluindo que a biossíntese de nisina é fortemente afetada por aminoácidos que contenham enxofre tais como metionina e cisteína.

Uma abordagem de estudo de otimização baseada em regulação gênica foi realizada por Qiao et al. (1997). Um mutante espontâneo, induzido por crescimento na presença de eritromicina, demonstrou produtividade 10 vezes superior, comparada à uma cepa selvagem. Posteriormente, verificou-se que a mutação estava ligada ao aumento na resistência da bactéria contra sua própria bacteriocina (denominada como auto-imunidade). Qiao et al. (1995) localizaram o gene denominado *nisI* responsável pela imunidade do microrganismo produtor contra a própria nisina produzida.

A análise dos genes promotores funcionais que determinam a ativação do sistema de síntese da nisina no genoma de *L. Lactis* foi adotada como possível fator de otimização de processo. Pascalle et al. (1996) verificaram que a regulação dos sistemas de síntese e bloqueio da produção da nisina são extremamente complexos. Dependem de três promotores, já identificados como um sítio de regulação transcripcional e dois promotores de regulação, além de mecanismos de auto-imunidade, que quando adequadamente regulados podem propiciar produções elevadas da bacteriocina.

A existência de vasta literatura, bem elucidativa, sobre a regulação gênica da síntese da nisina (Kuipers et al. 1993; Immonen et. al 1995, Rodriguez et al. 1996), é indicativo importante de possibilidades de regulação, fundamentais nos trabalhos de otimização e implementação tecnológica.

Em outra abordagem de otimização, alguns autores preferiram utilizar fatores relacionados ao processo. Amiali et al. (1998) estudaram a formação de nisina,

utilizando como meio soro de leite suplementado, com aeração controlada. Conseguiram a produção de nisina na ordem de 16400 a 20500 UI/mL, com nível inicial de aeração de 60% a pH 6,0 por 24 horas de processo a 30 °C. Apesar dos ótimos resultados, Hurst et al. (1981) descreveram a aeração como fator importante no equilíbrio nisina livre e associada à membrana celular. Como citado anteriormente, fatores como pH e concentração de oxigênio dissolvido podem alterar o equilíbrio de dissociação da nisina na sua forma livre (no seio da solução) e ligada à membrana, devido à sua natureza anfipática.

Isto é de interesse uma vez que interfere, diretamente, na facilidade de extração/ purificação da bacteriocina do processo. Se a bacteriocina da fase de separação ainda se encontra ligada à célula fica muito mais difícil o método de purificação.

Na mesma linha de desenvolvimento tecnológico, de se tornar viável a separação e purificação da nisina, Kim et al. (1997) propuseram a produção de nisina em meio usando duas fases, uma aquosa e outra orgânica, imiscíveis entre si. A fase orgânica constituída de óleo de fenil-metilsilicone provocava uma partição da bacteriocina aumentando em 240 % a produção em processo simples e contínuo.

Li et al. (2000) propuseram a produção de nisina por *Lactococcus lactis* em sistema de duas fases composta por polietilenoglicol/ MgSO₄ e fase aquosa (meio M₁₇ modificado).

Shimizu et al. (1999) realizaram processo de fermentação utilizando cultura mista de *Lactococcus lactis* crescendo em paralelo com *Kluyveromyces marxianus*. Como se sabe, cepas de *Kluyveromyces* podem utilizar lactato como fonte de carbono. O interesse nesta nova tecnologia seria de aumentar a produção ao se evitar controle de pH por adição de álcali ou uso de filtros de separação de cerâmica, que encarecem o processo. Além disso, pode-se facilmente controlar, separadamente a bioquímica de degradação do lactato pelo *Kluyveromyces* utilizando-se de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. O resultado descrito neste artigo mostrou interessante aumento de produção de nisina, que, em paralelo à facilidade de separação, melhorou tecnologicamente o processo industrial.

O uso de *Lactococcus lactis* IO-1 imobilizado foi estudado por Sonomoto et al. (2000). Foram testados vários métodos de imobilização assim como nível de degradação celular dentro dos “pellets” e disponibilidade de nutrientes da célula imobilizada. Observou-se que, em processo contínuo com taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$ houve aumento na produção de nisina de 1,7 a 2,0 vezes.

Em paralelo ao desenvolvimento de processo, estudos de formulação de meios de cultivo foram realizados na tentativa de otimizar o crescimento. Lopretti et al. (1998) realizaram interessante balanço de nitrogênio/carbono na produção de uma enzima a dextranacarase. O mesmo autor também estudou a natureza da fonte de carbono na produtividade.

Kim et al. (1997) avaliaram a cinética de produção de nisina frente a depleção de diversos nutrientes ausentes em meio sintético para estudo de regulação gênica da produção de nisina. Concluíram que, além da importância de glicose e sacarose como fontes de carbono, a produção de nisina é estimulada com fontes de nitrogênio complexas e com a presença de sais tamponantes tais como o dihidrogeno fosfato de potássio e citrato. Acordaram com o trabalho de Vuyst (1992) citado anteriormente, sobre a importância de aminoácidos sulfurados no rendimento global de nisina.

A adição de aminoácidos tais como serina, treonina e cisteína podem aumentar o rendimento de nisina. A adição do aminoácido asparagina tende a aumentar a produção de nisina Z (difere de nisina A apenas pela substituição de um resíduo de histidina na posição 27 por um resíduo de asparagina). Nisina Z apresenta-se como sendo de características muito próximas da nisina A, no que diz respeito à atividade antimicrobiana, no entanto é um pouco mais difusível e solúvel. (de Vos et al. 1993).

Hofvendahl et al. (2000) descreveram como fatores mais importantes na fermentação láctica: o tipo de microrganismo, regulação, modo de fermentação, pH e temperatura. São portanto fatores importantes de otimização de processo. Elli et al. (1999) incluíram como fatores importantes nutricionais ao crescimento de *Lactobacillus* fontes de composição desconhecida tais como extrato de levedura e peptonas, particularmente adicionadas ao leite, que apresenta carência em certos nutrientes

específicos (aminoácidos e açúcares). Fontes complexas de nutrientes são, muitas vezes de constituição variável atuando como fator que pode influir na produção.

Meghrou et al. (1992) estudaram em processo contínuo a produção de nisina por reciclo de células de *Lactococcus lactis*. Utilizaram em seu estudo fontes de carbono alternativas tais como xilose e lactose, como é comum em trabalhos de fermentação para produção de antibióticos. Avaliaram que existe um sistema sofisticado de repressão / desrepressão no controle da produção de nisina, assim como a ação de precursores e aminoácidos. Adicionalmente, detectaram a importância da fonte de nitrogênio como fator que interfere na aderência celular da nisina. Parwin et al. (1997) estudaram a produção de bacteriocinas em processo contínuo em biorreator de alta densidade. Obtiveram produtividades da ordem de 10^5 AU/L.h, cerca de 100 vezes maiores do que em processos em tipo descontínuo.

Trabalhando com xilose, Chinachotti et al. (1998) determinou que *L. lactis* IO-1 produziu nisina de maneira superior a um controle que utilizou glicose. A presença de íons Ca^{2+} interferem positivamente, aumentando em 50% a produtividade de nisina. Especulou-se sobre a ação dos íons cálcio aumentando a produtividade de nisina. Talvez exista uma ligação entre a conhecida ação desestabilizante de íons cálcio em membranas e a liberação da nisina para o seio da solução. Matsusaki et al. (1996) trabalharam com processo fermentativo para produção de nisina. Verificaram, também, a ação positiva de

íons cálcio em concentração de 0,1 M, e propiciaram condições otimizadas de produção de nisina Z em pH 5,5 em processo tipo descontínuo.

Algumas aplicações interessantes estão sendo desenvolvidas para nisina, como agente antibiótico em infecções provocadas por microrganismos resistentes a outros quimioterápicos como os da síndrome de infecção de cólon em pacientes aidéticos e contra *Stapyilococcus sp* e *Streptococcus sp* (Sears et al. 1992; Hancock, 1997) , ou contra *Helicobacter pilori*, agente conhecido como responsável por diversas etiologias de úlcera estomacal. Neste último caso, a nisina apresenta-se como excelente opção de agente terapêutico devido à sua elevada segurança toxicológica e sua grande atividade e estabilidade em baixo pH (Delves-Broughton, 1996).

Diferentes associações com nisina e outras substancias podem ser necessárias, cepas de *Listeria* adquiriram resistência as bacteriocinas Pediocina PA-1 e Bavaricina A (Rasch et al. 1998). A nisina se apresenta como alternativa interessante de controle à infecção alimentar por *Listeria*. (Davies et al. 1997) e por *Bacillus cereus* (Jaquette e Beuchat, 1998)

Vignolo et al. (1995) estudaram a produção de bacteriocina em meio MRS suplementado com extrato de levedura, glicose, triptona e Tween 80, em pH 6,5 a 7,0 – O Tween 80 é um agente dispersante, presente no meio MRS original, e sua suplementação pode estar ligada à sua ação dispersante, liberando a nisina da sua forma ligada à membrana para o seio do caldo de produção. Ocorreu aumento de cerca de

1000% na produção de Lactocin G e aumento de cerca de 400% na produção de Lactocin F (Muriana et. al., 1991) pela adição de Tween 80 no meio de produção, a ação dispersante do Tween, graças ao seu caráter anfipático ajuda na liberação da bacteriocina adsorvida na membrana celular.

Também de interesse é a aplicabilidade de nisina na forma polimérica em complexos de celulose ou polietileno/poliamida, na produção de embalagens para alimentos. Foram detectadas quedas de 1,5 a 2,8 ciclos logarítmicos de *Listeria innocua* em embalagens testadas (nível de contaminantes > 2 Logs em cada embalagem) - (Scanell et al., 2000)

3 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos principais :

- a) Contribuir para melhoria da tecnologia da produção de nisina, baseado em nova formulação de meio de fermentação.
- b) Obter os nutrientes (fatores) e as melhores proporções a serem utilizadas em meio para produção em processo tipo descontínuo.
- c) Avaliar a produção e os tempos de processo com vistas a otimizar o balanço de nutrientes e produtividade. Assim como obter parâmetros cinéticos para estudo em sistemas descontínuo-alimentado e contínuo.
- d) Obter condições de crescimento, em processo descontínuo que, comparadas a um grupo controle, levariam a otimização da produção de nisina, dentro das condições experimentais de trabalho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Cepas bacterianas, condições de crescimento e meios utilizados

As cepas bacterianas utilizadas (figura 02) em nosso estudo foram *Lactococcus lactis* (ATCC 15521) como cepa produtora de nisina e *Lactobacillus sake* (ATCC 9221), como cepa sensível. Foram ambas mantidas em Ultrafreezer -80 °C em meio MRS (DIFCO) suplementado com 40 % de glicerol. A célula sensível para o teste de atividade da nisina produzida *L. sake* foi cultivada em meio MRS por 24 horas a 30°C e 100 RPM. Após esse período foram adicionadas em MRS ágar para o método de difusão em ágar (Montville, 1991). As medidas de pH foram realizadas em potenciômetro Procyon modelo B₁₂. O meio MRS suplementado foi preparado a partir de seus constituintes básicos adicionando-se os nutrientes segundo o planejamento experimental a ser descrito. Os nutrientes utilizados foram, fosfato bibásico de potássio (Merck), sacarose (Carlo-Erba), asparagina (Sinth Chemical) e Polissorbato 80 (tween 80) (Merck).

Realizou-se, inicialmente um grupo de 12 ensaios iniciais com finalidade de verificar a ação de nutrientes e suas faixas de concentração testadas. A partir dos resultados iniciais pode-se definir sobre quais as condições de teste no planejamento experimental estatístico.

Os ensaios iniciais utilizaram três nutrientes (sacarose, fosfato bibásico de potássio e asparagina) para verificar, qualitativamente suas influências no crescimento e produção de diretrizes para verificar a direção dos testes no planejamento das fases posteriores do trabalho.

Figura 02 – Microrganismos utilizados: à esquerda *Lactococcus Lactis subsp Lactis* ATCC 11454; a direita *Lactobacillus sake* ATCC 9221.

4.2 - Ensaios e Planejamento Experimental

Foi proposto, inicialmente, planejamento experimental do tipo fracionário com quatro fatores, variando-se os níveis de -1 a +1, em modelo fatorial $2^{(k-1)}$, sendo k o número de fatores (denominado Grupo 01). Em seguida, expandimos o planejamento tipo fracionário 2^k com mais cinco pontos centrais e três ensaios de codificação livre (denominado Grupo 02), foi verificado que em tal grupo os pontos de máxima produtividade em nisina, assim a análise de regressão multiparamétrica foi realizada

dados. Finalmente ampliamos o nível dos fatores para -1,68 até +1,68 (denominado Grupo 03), visando aumentar a faixa de estudo, totalizando nos 3 grupos, 30 experimentos em processo tipo descontínuo (mostrados nas tabelas 1, 2 e 3).

Todos os nutrientes foram adicionados à formulação básica do meio MRS (Difco). Os ensaios foram conduzidos por 36 a 48 horas em “shaker” rotatório a 100 RPM de agitação e temperatura de 30 °C. O meio MRS suplementado era então transferido para Erlenmeyers de 250 mL, esterilizado, e inoculado com *Lactococcus lactis* e incubados em shaker rotatório marca Fanem por 36 a 48 horas.

Constituição do meio MRS –Difco (g/L):

Bacto proteose peptone n.III	10
Bacto beef extract.	10
Bacto yeast extract	5
Bacto Dextrose	20
Tween 80	1
Citrato de amônio	2
Acetato de sódio	5
Sulfato de Magnésio	0,1
Sulfato de Manganês	0,05
Fosfato bibásico de potássio	2

4.3 - Preparo de Inóculo

O procedimento para o preparo do inóculo se dava através da adição de 100 μL das células congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em glicerol 50%, inoculada a 50 mL de meio MRS (DIFCO), e então incubada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas a 100 RPM. Um volume de 5 mL do caldo de cultura após o crescimento ($\text{OD} = 0,7$) era então utilizado como inóculo para o processo em batelada.

4.4 - Métodos Analíticos

Todas as amostras foram analisadas para obtenção da concentração final de sacarose e ácido láctico. Utilizou-se o método de obtenção de ART de Somogyi-Nelson, (1952) após hidrólise ácida (5 mL de HCl 1,3 N por 15 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) para analisar açúcares redutores totais e titulometria com NaOH 0,1000 N ($f_c=0,9951$) previamente

Figura 2a – Metodologia analítica para correlação de massa seca.

padronizado para o obtenção do título de ácido láctico.

O fator de conversão da sacarose em ácido lático é calculado por $Y = 180/348$ (AcLat final – AcLat inicial)/ (Sacarose Inicial – Sacarose final) onde dois moles de ácido lático (180g) é resultante de um mol de sacarose (342g), para 100 % teóricos de conversão. A curva padrão sacarose utilizada pela metodologia de Somogyi-Nelson foi:

$$\text{ART (mg/L)} = 431,97 \text{ OD}_{540\text{nm}} - 9,0769 \quad (r^2 = 0,998)$$

Figura 2b- Metodologia analítica para análise de açúcar (Somoghi-Nelson).

Para obtenção de concentração celular utilizou-se leitura de densidade óptica (DO) ao comprimento de onda de 600 nm contra uma curva padrão de concentração celular de *Lactococcus lactis* obtida por gravimetria (membrana Millipore^R 0,22 µm). A leitura foi realizada em cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm em espectrofotômetro Incibrás MS UV\VIS com comprimento de onda de 600 nm. A curva

de calibração associando concentração celular com absorbância (ABS) a 600 nm utilizada foi:

$$X \text{ (mg /L)} = 0,012 + 1,4 \text{ ABS (600 nm)} \quad (r^2 = 0,998).$$

Para o preparo da curva padrão de nisina foi utilizada solução de Nisaplin (Sigma Chemical) contendo 25000 µg de nisina/g (10^6 AU/g). Antes de cada experimento uma solução estoque de nisina de 250 µg of nisina/ mL (10^4 IU/mL) foi preparada dissolvendo-se 0,1g of Nisaplin^R em 10 mL de HCl 0,02N, adicionada com 0,75% (m/v) de NaCl (pH = 1.6 – 1.8). A solução era esterilizada à 121°C/ 15 min.

Figura 3 – Equipamentos utilizados nos ensaios de crescimento:

Fluxo laminar para preparação do inóculo, ensaios, manuseio de cepas e tomada de amostras.

Shaker rotatório para os ensaios de fermentação.

Condições de cultivo: erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de volume de meio em processo descontínuo a 30 °C por 36 horas.

A determinação de atividade de nisina foi realizada pelo método de difusão em ágar previamente descrito por Montville (1992). A curva associando a produção de nisina em UA (unidades arbitrárias) em função do diâmetro do halo de inibição obtido era realizada a partir de incubação da placa contendo a célula sensível (*L. sake*) em estufa a 37 °C por 24 horas. As amostras foram padronizadas a pH =6,5 com NaOH 0,1N e então aplicado 50 µL em poços de aproximadamente 3 mm de diâmetro.

A medida do halo de inibição fornece uma estimativa da concentração de nisina em AU por mL (unidades arbitrárias por mililitro).

Fig 2c - Curva de calibração associando: concentração de nisina x diâmetro do halo de inibição foi: $D \text{ (cm)} = 0,2401 \text{ LOG } P + 1,0063$ ($r^2 = 0,9833$), onde Log P é o Log da potência da bacteriocina testada.

A partir dos resultados iniciais definiu-se os fatores a serem testadas na formulação do meio MRS modificado. Na tabela 1 estão mostradas as concentrações utilizadas de nutrientes (fatores) e suas proporções.

Verificou-se, a partir dos resultados dos 8 experimentos (grupo 1), indicaram que a interferência do tween no rendimento de nisina no processo em shaker, foi baixa. A partir de uma segunda proposta de planejamento (grupo 2) utilizamos os mesmos nutrientes, porém, aumentando a amplitude dos fatores, a análise deste grupo levou-nos a supor que para os dados iniciais o ponto de otimização estava qualitativamente relacionado aos fatores SAC e ASN e menos ligados ao fosfato e tween. Optamos então por ampliar os fatores de $-1,68$ até $+1,68$. Tal abordagem teve por finalidade aumentar a faixa de concentrações testadas e verificação de modelo não linear. (grupo 3).

Desta maneira, podemos analisar quantitativamente a interferência e amplitude dos fatores que se mostraram mais importantes na fase exploratória anterior.

O resultado da análise dos fatores que influenciam a produtividade da nisina mostrou que não houve valores máximos de produção da nisina em amplitudes maiores testadas (de $-1,68$ a $+1,68$), ou seja, na análise do grupo 3. Verificamos a presença do ponto de otimização nas condições nutricionais referentes aos ensaios do grupo 02, que levaram máxima a produtividade de nisina, nas condições testadas. Finalmente, realizamos um grupo de 05 experimentos de ponto central para refinarmos os dados na regressão.

A análise de regressão estatística, para os dados do grupo 02, gerou 8 equações que após as sequenciais análises, nos levou a verificar as proporções de nutrientes utilizados para otimização da produção de nisina nas condições deste estudo.

Figura 4 – Placas com meio MRS agar contendo o microrganismo sensível *Lactobacillus sake*, onde se avaliou a Potência de Nisina obtida pelo método de difusão em agar. (medida de halo de inibição)

TABELA 01 – Nutrientes e fatores adicionados ao caldo MRS, suas inter-proporções e valores codificados para o planejamento (entre parêntesis) – Grupo 01.

Grupo 01- Ensaios 01 a 08

Ensaio	Nutrientes			Proporções				
	Sacarose	Asparagina	Fosfato	Tween ¹	C/N ²	C/P ³	N/P ⁴	T/P ⁵
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)				
1	2 (-1)	1,5 (-1)	3 (-1)	2,1 (-1)	1,33	0,67	0,50	0,70
2	5 (+1)	1,5 (-1)	3 (-1)	6,6 (+1)	3,33	1,67	0,50	2,20
3	2 (-1)	15 (+1)	3 (-1)	6,6 (+1)	0,13	0,67	5,00	2,20
4	5 (+1)	15 (+1)	3 (-1)	2,1 (-1)	0,33	1,67	5,00	0,70
5	2 (-1)	1,5 (-1)	6 (+1)	6,6 (+1)	1,33	0,33	0,25	1,10
6	5 (+1)	1,5 (-1)	6 (+1)	2,1 (-1)	3,33	0,83	0,25	0,35
7	2 (-1)	15 (+1)	6 (+1)	2,1 (-1)	0,13	0,33	2,50	0,35
8	5 (+1)	15 (+1)	6 (+1)	6,6 (+1)	0,33	0,83	2,50	1,10

TABELA 02 – Nutrientes e fatores adicionados ao caldo MRS, suas inter-proporções e valores codificados para o planejamento (entre parêntesis) – Grupo 02.

Grupo 02- Ensaios 09 a 24

Ensaio	Nutrientes			Proporções				
	Sacarose (g/L)	Asparagina (g/L)	Fosfato (g/L)	Tween ¹ (g/L)	C/N ²	C/P ³	N/P ⁴	T/P ⁵
9	12,5 (+1)	75 (+1)	18 (+1)	6,6 (+1)	0,17	0,69	4,17	0,37
10	12,5 (+1)	75 (+1)	6 (-1)	2,1 (-0,61)	0,17	2,08	12,50	0,35
11	12,5 (+1)	75 (+1)	18 (+1)	2,1 (-0,61)	0,17	0,69	4,17	0,12
12	5 (-1)	7,5 (-1)	6 (-1)	1,0 (-1)	0,67	0,83	1,25	0,17
13	12,5 (+1)	7,5 (-1)	6 (-1)	1,0 (-1)	1,67	2,08	1,25	0,17
14	5 (-1)	75 (+1)	6 (-1)	1,0 (-1)	0,07	0,83	12,50	0,17
15	12,5 (+1)	75 (+1)	6 (-1)	1,0 (-1)	0,17	2,08	12,50	0,17
16	5 (-1)	7,5 (-1)	18 (+1)	1,0 (-1)	0,67	0,28	0,42	0,06
17	12,5 (+1)	7,5 (-1)	18 (+1)	1,0 (-1)	1,67	0,69	0,42	0,06
18	5 (-1)	75 (+1)	18 (+1)	1,0 (-1)	0,07	0,28	4,17	0,06
19	12,5 (+1)	75 (+1)	18 (+1)	1,0 (-1)	0,17	0,69	4,17	0,06
20	8,75 (0)	41,25 (0)	12 (0)	1,0 (-1)	0,21	0,73	3,44	0,08
21	8,75 (0)	41,25 (0)	12 (0)	1,0 (-1)	0,21	0,73	3,44	0,08
22	8,75 (0)	41,25 (0)	12 (0)	1,0 (-1)	0,21	0,73	3,44	0,08
23	8,75 (0)	41,25 (0)	12 (0)	1,0 (-1)	0,21	0,73	3,44	0,08
24	8,75 (0)	41,25 (0)	12 (0)	1,0 (-1)	0,21	0,73	3,44	0,08

TABELA 03 – Nutrientes e fatores adicionados ao caldo MRS, suas inter-proporções e valores codificados para o planejamento (entre parêntesis) – Grupo 03.

Grupo 03- Ensaios 25 a 30

Ensaio	Nutrientes			Proporções				
	Sacarose (g/L)	Asparagina (g/L)	Fosfato (g/L)	Tween ¹ (g/L)	C/N ²	C/P ³	N/P ⁴	T/P ⁵
25	2,25(-1,68)	41,25 (0)	12 (0)	1,0	0,05	0,18	3,44	0,08
26	15(+1,68)	41,25 (0)	12 (0)	1,0	0,36	1,25	3,44	0,08
27	8,75 (0)	7,5(-1)	12 (0)	1,0	1,17	0,73	0,63	0,08
28	8,75 (0)	98(+1,68)	12 (0)	1,0	0,09	0,73	8,17	0,08
29	8,75 (0)	41,25 (0)	6 (-1,68)	1,0	0,21	1,46	6,88	0,17
30	8,75 (0)	41,25 (0)	22 (+1,68)	1,0	0,21	0,40	1,88	0,05

Índices:

1- Tween 80, adicionado ao meio original (Caldo MRS DIFCO)

2- C/N= Sacarose/asparagina: (m/m)

3- C/P= Sacarose/fosfato: (m/m)

4- N/P=asparagina/fosfato: (m/m)

5- T/P= Tween/fosfato: (m/m)

Cálculo dos valores codificados:

Variável codificada (Vc)= $\{[(\text{concentração do nutriente}) - (\text{concentração do nutriente máxima} + \text{concentração do nutriente mínima})/2] / (\text{concentração do nutriente máxima} - \text{concentração do nutriente mínima})/2\}$.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Ensaios Iniciais

5.1.1 - Cultivos em MRS, sem adição de outros nutrientes.

Verificamos nos experimentos iniciais, uma fase de adaptação da cultura de células de *Lactococcus lactis* ao meio de cultivo de MRS. Nos ensaios de E1 a E6 (figura 5), quando os valores de produtividade de nisina aumentaram proporcionalmente à constante de velocidade específica de crescimento (decréscimo do valor de pH), em função da evolução dos ensaios. Os valores de μ para os ensaios de E1, E2, E3, E4, E5 e E6 e respectivamente foram ($\times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$): 3,05; 3,17; 3,72; 3,65; 5,69 e 5,39; as produtividades máximas (em AU/mL.h) foram: 2,878; 3,563; 2,672; 3,001; 22,5; e 4,185, e menores valores pH ao final do processo de 6,2; 6,05; 5,5; 5,5; 5,12 e 5,1 respectivamente (tabela 6).

À medida que ocorreu adaptação do desenvolvimento celular no caldo MRS, inóculos iniciais decrescentes foram exigidos (tabela 6) . Assim observamos que a absorbância inicial a 660 nm foi reduzida em 86%, isto é, de 0,65 Unidades de Absorbância (UA) no ensaio E1, foi diminuindo gradativamente, para 0,5 UA no E2; 0,4 UA no E3; 0,36 UA no E4; 0,12 UA no E5; 0,09 UA no E6.

No ensaio E5, o valor de produção de nisina foi de 855 AU/mL após 36 horas de crescimento, o valor máximo do grupo. Fica evidente que a atividade celular do inóculo, após 5 ensaios é bem maior que os outros, isso se refletiu na produtividade de nisina que cresceu em 710 %, de 0,00530 mg/L.h para 0,03763 mg/L.h.

Figura 5 – Dados de produtividade específica, pH e Produção de nisina para os ensaios sem adição de nutrientes.

Segundo o dados referentes aos ensaios de E1 a E5 deste grupo (tabela 6), verifica-se que, após 36 h de incubação, observa-se o final da fase logarítmica de crescimento celular e início da fase estacionária de crescimento celular, com produtividade máxima de nisina, visto a produção estar associada ao metabolismo primário do microrganismo.

Observa-se que após 36 h de ensaio, a produção de nisina foi máxima correspondendo a valores de (mg/L): 25,90 (E1); 28,51 (E2); 17,65 (E3); 28,51 (E4); 41,85 (E5) e 41,85 (E6) (tabela 6). Verifica-se igualmente que para tempos de cultivo maiores de 48 h, houve redução em cerca de 50% da produção de nisina, em relação às 36 horas; sendo esta redução mostrada em E2 (28,51 mg/L), no E3 (17,65 para 9,02 mg/L), em E4 (28,51 para 5,07). Para os ensaios E2, E3 e E4 tempos de cultivo acima de 36 horas levaram a perda de atividade em cerca de 50% (de 28,51 para 12,02 mg/L em E2 e de 17,65 para 9,02 em E3), fenômeno este talvez ligado a processo de readsorção da bacteriocina pela membrana das células (função do pH; $\text{pH} < 6$ a nisina se encontra livre; em $\text{pH} > 6$ a nisina fica adsorvida à membrana celular).

Figura 6 – Correlação entre produção de nisina e concentração celular máxima (mg/L) para os ensaios iniciais sem adição de nutrientes.

Em tempos de cultivo menores de 24 horas as produtividades específicas foram 10 vezes menores em relação às obtidas após 36 h de desenvolvimento, em grande parte do ensaios, caracterizando estar o *Lactococcus lactis* no início da fase de crescimento exponencial. O valor do pH e a velocidade específica de crescimento foram inversamente proporcionais. A fase exponencial tardia e início da fase estacionária é acompanhada pelo abaixamento do valor de pH devido à transformação metabólica da fonte de carbono (sacarose) em ácido láctico (pHs de 5,12 e 5,10 para os ensaios E5 e E6 respectivamente). Como mencionado, pHs menores favorecem a liberação de nisina da membrana e parede celulares aumentando seu rendimento global.

A produção de nisina após 36 horas de cultivo é máxima para todos os ensaios, visto coincidir com o final da fase logarítmica e início da fase estacionária. Como o crescimento microbiano está associado à produção de nisina, para tempos maiores de incubação, em torno de 48 horas, a produção estaciona ou diminui. A escolha de 36 horas para tempos de crescimento associa-se diretamente à máxima de produção de nisina, nestas condições.

Nos ensaios iniciais observamos a adaptação das células ao processo de produção da nisina. Pôde-se verificar isso a partir da análise dos valores de cada um dos crescimentos, da velocidade máxima de crescimento cresce de 0,0305 h⁻¹ no primeiro ensaio, gradativamente até 0,0539 h⁻¹ no ensaio 6.

5.1.2 - Cultivos iniciais em MRS com adição de sacarose

Com a adição de sacarose (5g/L) no meio MRS, verificou-se que os valores de μ permaneceram ao redor de $0,041 \text{ h}^{-1}$, e, portanto, próximos àqueles observados para os ensaios iniciais sem adição de nutrientes, indicando que nesta fase, a adaptação das células ao meio de cultivo já ocorrera e as diferenças de velocidade se devam à variáveis de processo não controladas (aeração, pH). Os valores de produtividade para este grupo de ensaios se mostraram muito superiores aos demais (grupo sem adição de nutrientes e grupo com adição de asparagina) indicando ser a sacarose extremamente importante na otimização.

Figura 7 - Variação de pH, produção de nisina e concentração celular para os ensaios iniciais com adição de sacarose 5,0 g/L.

Estes dados podem ser observados a partir dos valores da tabela 8, nesta observamos que, apesar de μ permanecer praticamente constante os valores de produtividade aumentam (de E1 a E4) de 0,62; 1,961; 9,74 e 34,87 AU/mL.h para tempos de 36 de processo (tabela 8)

Para concentração de sacarose de 5,0 g/L adicionada, a produtividade praticamente se manteve em valores crescentes (25,9; 28,51; 17,65; 28,51; e 41,8 AU/mL.h para E1, E2, E3, E4 e E5 respectivamente), a produtividade específica ficou em valores intermediários (0,48 mg/mg de massa celular) em relação aos ensaios iniciais sem adição de nutrientes.

5.1.3 - Cultivos iniciais em MRS com adição de Asparagina.

As produtividades em nisina para este grupo de ensaios ficaram menores em relação aos demais resultados dos grupos com adição de sacarose. Destacamos a produtividade para o ensaio ASN 2 e 3 (tabela 7); neste a produtividade ficou em 10,92 AU/mL.h, como indicativo de excesso da presença da fonte de nitrogênio no meio testado para as células na transformação. Verificamos o aumento concomitante de produção de nisina em função do aumento das concentrações de asparagina adicionados dentro do grupo (0,02; 0,04 e 0,1M) mostra-se que ocorre aumento de produtividade (de 0,026 para 10,9 AU/mL.h). Analisando-se este fenômeno, em relação ao grupo controle, verificamos que a produtividade ficou abaixo do esperado (10,9 AU/mL.h neste grupo em relação a 22,5 AU/mL.h no máximo do grupo sem adição de nutrientes).

Os valores finais de pH, para os ensaios E1, E2 e E3 ficaram em 5,8; 5,5 e 5,1 o que demonstra juntamente com o maior consumo de substrato e aumento da produtividade de 2,851 até 10,923 AU/mL.h., que a fonte de nitrogênio adicionada se mostrou importante, porem indicou que há necessidade de um balanço relativo entre suas concentrações no meio de produção. A sacarose, unicamente, é capaz de aumentar a produtividade, no entanto a fonte de nitrogênio asparagina deve estar balanceada com outros nutrientes para apresentar vantagens em termos de proposta de novo meio de produção.

Figura 8- Produtividade específica, concentração celular e produção de nisina para os ensaios iniciais com adição de asparagina.

Os valores de produtividade comparados com os ensaios em que houve adição de outros nutrientes, tais como sacarose (SAC) e asparagina (ASN) mostraram que, para concentração de sacarose de 5,0 g/L adicionados, as produtividades mantiveram-se em valores crescentes (25,9; 28,51; 17,65; 28,51; e 41,8 AU/mL.h para E1, E2, E3, E4, E5 e E6 respectivamente), a produtividade específica ficou em valores intermediários (0,48 mg/mg célula) em relação aos ensaios iniciais sem adição de nutrientes.

Figura 09 – Típico ensaio de crescimento do grupo Inicial, a partir dos valores de inclinação, crescimento e velocidades.

Podemos comparar a partir dos parâmetros de processo e inferência positiva ou negativa dos nutrientes testados nessa etapa.

De uma maneira geral para os grupos de ensaios iniciais, com ou sem adição de nutrientes, as mudanças de atividade de produção de nisina, nas células de *Lactococcus lactis* podem estar ligadas:

- i- Fase de adaptação em relação aos novos meios de cultivo propostos nos repiques sucessivos para preparo de inóculo.
- ii- velocidade de metabolização diferentes devido ao pH do meio se alterar durante o tempo, que se reflete no abaixamento de pH e proporcionalmente na velocidade de crescimento.
- iii- O balanceamento adequado dos nutrientes do novo meio proposto é necessário. Os nutrientes adicionados são responsáveis pelo aumento da produção dependentemente de suas proporções entre si.

O abaixamento de pH é indicativo de fermentação elevada da fonte de carbono pela bactéria láctica. Além disso, o processo de liberação da bacteriocina da membrana celular é favorecido. Pode-se observar isto no ensaio 04 do grupo de ensaios iniciais com adição de sacarose, valores de pH abaixo de 5,0 no final do processo levaram a mais elevada produtividade de nisina ($P = 34,9 \text{ AU/mL.h}$) em 36 horas de cultivo.

A partir dos ensaios iniciais totais detectamos que:

- 1- O tempo de processo que leva a produtividades apreciáveis entre e intragrupos analisados é de, em torno de 36 horas.
- 2- A sacarose é fator fundamental de otimização como nutriente e como agente indutor de síntese de nisina.
- 3- A asparagina apresenta fator de otimização; no entanto, depende de balanceamento com outros nutrientes.
- 4- Adição de outros fatores para favorecer a produção de nisina (fosfatos, Tween 80, etc) pode ser utilizado para otimização, no entanto dependem também de proporções entre os nutrientes ou fatores.
- 5- Como as condições e proporções entre os nutrientes levam a um conjunto elevado de combinações, o estudo por tentativa e erro se torna impossível para 4 tipos de nutrientes sendo indicado um estudo mais abrangente tal como planejamento experimental para uma possível otimização de processo
- 6- Alguns valores de máximo de produtividade foram obtidos no intervalo entre 36 e 40 horas de processo, assim sendo procederemos ao estudo de planejamento com grupos de 36 e 48 horas de crescimento.

5.2 - Grupos do Planejamento Experimental

5.2.1 - Grupo 01 (Ensaio 01-08); Grupo 02 (Ensaio 09-24) e Grupo 03 (Ensaio 25-30).

Realizamos a análise dos resultados, seqüencialmente aos grupos do planejamento descritos anteriormente. A partir dos experimentos de planejamento fracionário do tipo 2^{4-1} (quatro fatores, já descritos), apresentados nos primeiros oito experimentos (grupo 1, tabela 10 ensaios 01-08) verificamos, nesta etapa, a baixa interferência do fator Tween no rendimento de nisina no processo em shaker. Baseados nesta evidência, propusemos um segundo planejamento (grupo 2) onde não variamos o fator tween, e mantivemos as distribuições de um planejamento tipo fracionário 2^3 , totalizando 8 ensaios, adicionalmente agrupamos neste mais cinco ensaios de ponto central, além de 3 ensaios de codificação livre, totalizando para o grupo 2 um total de 16 ensaios. Os ensaios de codificação livre de 09 a 11, foram gerados a partir de evidências das faixas de nutrientes que seriam interessantes ao estudo, de maneira exploratória.

Os ensaios foram realizados com os fatores descritos de acordo com a tabela 03. Optamos pelo crescimento em “shaker” em frascos tipo erlenmeyer de 250 mL devido à grande variedade de condições nutricionais para a produção de nisina testados.

TABELA 04 – Nutrientes e fatores adicionados ao caldo MRS utilizados na análise de regressão multiparamétrica em função do título de nisina obtido para cada ensaio. Agrupou-se os ensaios do planejamento do grupo 02 mais os ensaios de ponto central (com tween 80 fixo em 1,0 g/L), mais 3 ensaios (9, 10 e 11) de codificação livre.

Ensaio	Fatores				Atividade Máxima de Nisina
#	SAC	ASN	FOS	TWN	(AU/mL)
9	(+1)	(+1)	(+1)	(+1)	16700
10	(+1)	(+1)	(-1)	(-0,61)	3,97
11	(+1)	(+1)	(+1)	(-0,61)	15200
12	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	7770
13	(+1)	(-1)	(-1)	(-1)	77
14	(-1)	(+1)	(-1)	(-1)	70,6
15	(+1)	(+1)	(-1)	(-1)	39,7
16	(-1)	(-1)	(+1)	(-1)	4810
17	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)	8550
18	(-1)	(+1)	(+1)	(-1)	85,5
19	(+1)	(+1)	(+1)	(-1)	18400
20	(0)	(0)	(0)	(-1)	3970
21	(0)	(0)	(0)	(-1)	4370
22	(0)	(0)	(0)	(-1)	1670
23	(0)	(0)	(0)	(-1)	2030
24	(0)	(0)	(0)	(-1)	2030

5.3 - Análise de Regressão Múltipla.

A análise de regressão foi realizada e aplicada aos dados relacionados ao Log da Potência da nisina obtida (variável dependente), obtida a partir da potência da nisina ao fim da fase de crescimento exponencial para os ensaios #9 ao #24. A análise de regressão forneceu um modelo quadrático polinomial: $\text{Log}_{10}\text{AU/mL} = 1,98905 - 0,213558 x_2 + 1,80028 x_3 - 1,40776 x_4 + 0,23436 x_1 x_2 + 0,35936 x_1 x_3 + 1,47217 x_3 x_4$, para as variáveis independentes codificadas; x_1 = sacarose; x_2 = asparagina; x_3 = fosfato de potássio e x_4 = tween 80. A análise dos coeficientes estatísticos a um nível de significância $p < 0,05$ demonstrou que o polinômio obtido foi consistente com os dados. A interpretação geométrica mostra a tendência causada pelas variáveis independentes onde x_1 , x_2 , x_3 , e x_4 , que foram não lineares com o Log da potencia da nisina por mL (Log_{10} AU/mL). As contribuições individuais do fosfato (x_3) positiva e do tween 80 (x_4) negativa foram similares em módulo, e respectivamente, 8,5 vezes e 6,7 vezes maiores que as influências negativas da asparagina (x_2) no $\text{Log}_{10}\text{AU/mL}$. A associação positiva do fosfato com o Tween 80 ($1,47 x_3 x_4$) correspondeu a 6,4 vezes e 4,0 vezes, respectivamente às interações entre a sacarose e a asparagina ($0,23 x_1 x_2$) e sacarose e fosfato ($0,36 x_1 x_3$).

A influencia individual negativa do tween 80 (x_4) pôde ser neutralizada pela contribuição positiva do fosfato (x_3), nas condições $x_4 = -1$ e $x_3 = +1$. A influência da asparagina (x_2) pôde também ser neutralizada em $x_2 = +1$ e $x_1 = +1$, com a interação entre sacarose e asparagina ($0,23 x_1 x_2$). Adicionalmente, a atividade da nisina dependeu do nível de sacarose e da interação entre fosfato e tween. Interações entre fosfato e tween, sacarose e asparagina, sacarose e fosfato são mostrados nos gráficos das figuras 11 a 18.

O melhor intervalo de proporções entre nutrientes (C= sacarose, N= asparagina, P = fosfato, T = tween), os quais levaram a aumento da produção de nisina, foram verificados (Tabela 19). Estas proporções foram avaliadas no modelo polinomial e aplicadas aos casos estabelecidos (figuras 11 a 18). Na condição de sacarose e asparagina mantidos aos máximos níveis ($x_1 = +1$ e $x_2 = +1$), equação 1, a atividade de nisina foi expressa pela equação: $\text{Log}_{10}\text{AU/mL} = 2,0098 + 2,1596 x_3 - 1,4077 x_4 + 1,4721 x_3 x_4$. Para fosfato mantido em nível máximo ($x_3 = +1$), independente do tween 80 mantido em nível máximo ($x_4 = +1$) ou mínimo ($x_4 = -1$), a produção de nisina atingiu sua melhor produção entre: $4,10 \text{ Log}_{10} \text{ AU/mL}$ e $4,23 \text{ log}_{10} \text{ AU/mL}$. Para estas condições as proporções entre os nutrientes foram: $C/N = 0,17$; $C/P = 0,69$; $N/P = 4,17$; as quais foram adotadas como ótimas para a produtividade de nisina (calculada a partir de preparação padrão de nisina com atividade de $1,0 \times 10^5 \text{ AU/mL}$) de cerca $6,0 \text{ mg/mg}$ de células. Válidos para os ensaios #9, #11 e #19 com títulos de nisina, respectivos de ($\text{log}_{10} \text{ AU/mL}$): 4,22; 4,18; e 4,27 (Tabela 19), embora T/P Para concentrações mínimas

de fosfato e tween, as relações C/P (2,08) e N/P (12,50) aumentadas em 3 vezes em relação às adotadas como otimizadas. A condição indicada mostra fosfato como fator limitante, com produção proporcionalmente menor ($2,73 \text{ Log}_{10} \text{ AU/mL}$), demonstrado no ensaio #15, com $2,60 \text{ Log}_{10} \text{ AU/mL}$.

Ao manter fosfato ($x_3 = -1$) em seu nível mínimo, porém com tween em seu nível máximo, a formação de nisina foi mantida em concentração basal. Mostrado pelo ensaio #10 com obtenção de $1,60 \text{ Log}_{10} \text{ AU/mL}$ (Tabela 19), quando da relação = 0,35; o dobro do valor 0,17 adotado como otimizado. Quando as relações entre outros nutrientes foram às mesmas para ensaios #10 e #15. Valores mais baixos de relação T/P mostraram tendência de aumento da produção de nisina. Entretanto, a quantidade original de tween presente no meio MRS se mostrou suficiente para boa produção de nisina.

Para ambas, sacarose ($x_1 = -1$) e asparagina ($x_2 = -1$) mantidos nos níveis mínimos, correspondente a equação 2 (tabela 12), o modelo para atividade de nisina adequado foi: $\text{Log}_{10} \text{ AU/mL} = 2,4369 + 1,4434 x_3 - 1,4077 x_4 + 1,4721 x_3 x_4$. Equivalência foi observada mantendo-se fosfato em mínimas ou máximas concentrações. No entanto quando tween 80 foi mantido em sua concentração mínima e fosfato também mantido em sua concentração mínima, a atividade de nisina variou entre 3,81 e $3,94 \text{ Log}_{10} \text{ AU/mL}$, observado nos ensaios #12 ($3,89 \text{ Log}_{10} \text{ AU/mL}$) e #16 ($3,68 \text{ Log}_{10} \text{ AU/mL}$). Neste caso a relação C/N = 0,67 foi constante e bem maior que a ideal

$C/N = 0,17$, adotada como ótima. O uso de $C/P = 0,28$ esteve 2,5 vezes menor do que os valores ótimos ($C/P = 0,69$); $N/P = 0,42$ estando 10 vezes menor do que o valor considerado como ótimo ($N/P = 4,17$), indicando que o fosfato, possivelmente, estava em excesso em relação aos outros nutrientes. Inibição da produção de nisina ocorre quando da manutenção de fosfato em seu nível mínimo e tween em seu nível máximo, confirmando a dependência do fosfato sobre o tween 80.

Para sacarose e asparagina mantidas em concentrações mínimas, a produtividade específica máxima de nisina diminuiu para cerca de 0,80 mg/mg de células (Ensaio #12 e #16).

Ao estabelecer concentrações de sacarose em $x_1 = +1$ e asparagina $x_2 = -1$, equação 3 (tabela 13), a atividade estimada pelo modelo foi: $\text{Log}_{10} \text{AU} = 1,9682 + 2,1596 x_3 - 1,4077 x_4 + 1,4721 x_3 x_4$. Mantendo-se fosfato $x_3 = +1$, independentemente da concentração de tween 80 ($x_4 = \pm 1$), a atividade estimada de nisina foi igualmente máxima, variando de 4,06 to 4,19 $\text{Log}_{10} \text{AU/mL}$, detectado no ensaio # 17 (Tabela 19). A proporção de nutrientes: $C/P = 0,69$ permaneceram iguais ao caso da equação 13, enquanto $C/N = 1,67$ foi 10 vezes maiores e $N/P = 0,42$ foi 10 vezes menor do que as relações no caso da equação, adotada como ótimas. Para as condições testadas, a proporção C/P foi demonstrada como sendo a mais importante para a produção de nisina durante o crescimento da biomassa. Sacarose, a fonte de carbono mostrou-se indispensável para o desenvolvimento celular o desenvolvimento da biomassa e

conseqüente produção da nisina, com fosfato mantido em seu nível mínimo, abaixaram o título de nisina para 2,69 Log_{10} AU/mL, demonstrado no ensaio #13, para proporções de $C/P = 2,08$ e $N/P = 1,25$, fosfato se mostrou insuficiente em relação a asparagina. Para fosfato em $x_3 = -1$ e tween $x_4 = +1$, a atividade de nisina não foi detectada.

Mantendo-se sacarose $x_1 = -1$ e a asparagina em $x_2 = +1$, (equação 4, tabela 19), a atividade de nisina estimada pelo modelo foi: $\text{Log}_{10} \text{AU} = 1,4161 + 1,80003 - 1,4077 x_4 + 1,4721 x_3 x_4$, variando a atividade obtida entre -2,38 a 3,41 Log_{10} AU/mL, independente do fosfato em níveis máximo ou mínimo. Relações de nutrientes foram: $C/N = 0,067$, muito abaixo da proporção ótima; C/P variou de 0,28 a 0,83 e N/P variou de 4,17 a 12,50, indicando novamente um excesso de fonte de nitrogênio, asparagina na relação com sacarose e fosfato. Para tween em $= +1$, embora as relações tivessem se mantido, levou a um decréscimo da produção de nisina para nível não detectável (equação 8, tabela 18). Mostrado nos ensaios #14 e #18 (Tabela 19), em função da deficiência de sacarose ocorreu abaixamento da potência, atingindo níveis de 2,85 e 2,93 $\text{Log}_{10}\text{AU/mL}$, respectivamente, abaixando a produtividade específica máxima de nisina para cerca de 0,03 mg/mg de células.

A análise destes casos (tabela 19), demonstrados pelas proporções entre os nutrientes, os quais contribuíram favoravelmente para obtenção dos melhores valores de título de nisina, em média de 4,0 Log_{10} AU/mL : (i) $C/N = 0,17$; $C/P = 0,69$; $N/P = 0,42$; e (ii) $C/N = 1,7$, $C/P = 0,69$, $N/P = 4,7$. Mantendo-se constantes estas condições a

produção específica de nisina ficou em cerca de 22 AU/ mg de células, correspondendo a uma media de 6,0 mg nisina por mg de célula, demonstrados nos ensaios #09, 11 e 19 (Tabela 19, figura 10). Para proporções de nutrientes em intervalo intermediário das proporções ditas ótimas, ou seja , quando: $0,17 < C/N < 1,7$ e $0,42 < N/P < 4,16$, e mantendo-se a faixa $0,69 < C/P < 0,83$, o título de nisina variou entre 2,6 e 3,9 $\text{Log}_{10}\text{AU/mL}$, demonstrados nos ensaios de 25 a 30.

Os resultados mostraram a importância da adição equilibrada de nutrientes ao meio MRS em proporções equilibradas, os quais levaram ao melhor balanço de nutrientes no meio de fermentação em processo descontínuo, e em pH não controlado. A produção de nisina claramente acompanha produção de biomassa, mostrando, pelos nossos dados metabolismo primário. Para sacarose e asparagina em concentrações máximas (Tabela 1), ensaios números 4, 9, 11 e 19, a atividade de nisina já é detectável após apenas 12 horas de cultivo (AU/mL: 4,81, 1,98, 7,77, 6,41, respectivamente), aumentando cerca de 2 Log_{10}AU após 24 horas de cultivo para (AU/ mL: $2,98 \times 10^2$, $3,61 \times 10^2$, $7,06 \times 10^2$, $1,14 \times 10^2$, respectivamente).

A atividade específica máxima de nisina (calculada a partir de uma preparação pura de nisina com atividade de $1,0 \times 10^5$ AU/mL) obtendo-se aproximadamente (mg nisina/ mg células) 1,76; 6,46; 5,67 e 5,87, respectivamente para os ensaios 4, 9, 11 e 19. A relação de nutrientes satisfeitas em cada condição

estabelecida, indicaram: C/N= 0,17; C/P= 0,69; N/P= 4,17 como referencia para levar ao máximo de produtividade específica de nisina (mg nisina por mg células) de 6,56, 5,67, e 5,87 para os ensaios 9,11 e 19 respectivamente.

Verifica-se, portanto, que existe forte evidência de que há correlação positiva entre produção de nisina e formação de biomassa de *L. lactis*, os quais dependem do balanço de nutrientes presentes no meio de cultivo.

A menor atividade de nisina (298 AU/mL) correspondeu às concentrações mínimas de asparagina (1,5 g/L) e de fosfato (3,0 g/L), porém para concentração máxima de Tween (6,6 g/L). Para concentração 10 vezes superior de asparagina (15 g/L), mantendo-se fosfato e Tween nas mínimas concentrações, o título da nisina elevou-se em 16 vezes ($4,8 \times 10^3$ AU/mL). Para as concentrações máximas dos componentes adicionados ao meio MRS, o título da máxima da nisina elevou-se para $7,8 \times 10^3$ AU/mL.

Observou-se que quando a sacarose foi mantida em 2 g/L a elevação em 10 vezes da concentração de asparagina (de 1,5 para 15,0 g/L), elevou o consumo de sacarose de 50,5 % para 80,5 %, correspondendo em 30 % de aumento na atividade da nisina. Isso demonstrou que a asparagina, à concentração de 15 g/L, não era mais fator limitante no consumo da sacarose. Bloom et al. (1997) indicaram que nisina tem afinidade pela superfície celular em pHs próximos do neutro. A nisina assim adsorvida pode ser liberada “in vitro” pelo abaixamento do pH. (Liu e Hansen, 1990)

Demonstrou-se que a solubilidade aumenta muito quando do abaixamento do pH até 5,5.

Nos oito ensaios do primeiro grupo, observou-se que o valor de pH variou entre 5,40 a 5,90, correspondendo às concentrações máximas e mínimas de sacarose e asparagina para títulos máximos $4,81 \times 10^3$ AU/mL e mínimos de $3,97 \times 10^3$ AU/mL de nisina.

Entretanto nós assumimos que a não detecção de nisina em alguns ensaios pode refletir o fato de não haver quantidade suficiente de acidez para o abaixamento de pH requerido para a desorção. Conseqüentemente, pelo abaixamento do pH até 5,5 com HCl nos estágios iniciais de crescimento, estaremos aptos a avaliar a real quantidade de nisina presente, tanto no seio da solução, quanto adsorvida à superfície da célula.

A queda da quantidade de nisina na fase estacionária, pode estar ligada à atividade não específica de enzimas proteolíticas (de Vuyst e Vandamme, 1992)

5.4 - Influência dos fatores

Concentrações de sacarose maiores que 10 g/L, resultam em elevada biomassa, porém não aumenta a atividade da nisina concomitantemente (VanDamme, 1992). Não há relação linear entre a biomassa formada e o nível de produção de nisina, porém verificamos correlação positiva (figura 20). A sacarose à concentração de 12,5 g/L forneceu a maior produtividade específica de nisina (19 mg/ g Células)

A asparagina tem participação na estrutura de aminoácidos da nisina, sua carência pode diminuir o rendimento de produção do antimicrobiano e sua adição foi proposta como constituinte de meio de cultivo.

A influência positiva dos nutrientes sacarose e fosfato são demonstrados na figura 21. Verificamos que tais nutrientes atuam cooperativamente na produção de nisina, em proporção discreta.

Figura 10 - Produtividades média e específica para os ensaios dos grupos planejados, verifica-se os máximos de produtividade para os ensaios 9, 11 e 19. Observa-se também correlação entre as duas produtividades o que indica produção ligada ao crescimento (metabolismo primário).

A partir dos dados de velocidade específica de crescimento celular não foi possível correlacionar μ com os rendimentos máximos de nisina obtidos. Isto se deve, provavelmente, a uma fração considerável do antibiótico que fica adsorvida à superfície da membrana celular em pHs em torno de 5,0 na fase exponencial de crescimento em processo descontínuo, com o abaixamento de pH devido à formação de ácido láctico. Verificamos que, nos meios com adição de nutrientes em que a proporção P/C em torno de 1,44 obtivemos altos valores de nisina produzida (figura 21). Isto pode se dever à

ação tamponante do fosfato de potássio. Deste primeiro grupo de ensaios podemos observar a influência da sacarose em associação com asparagina e fosfato na formação de nisina. O Tween não apresentou interferência na síntese da nisina quando em associação com os demais componentes, estatisticamente comprovados ($p < 0,05$).

A ação do Tween 80 também está ligada ao fenômeno de dispersão da nisina da membrana para o meio de cultivo. Apesar de adicionado em pequenas quantidades no planejamento experimental, seu efeito não pôde ser negligenciado.

O abaixamento do valor de pH para 4,0 é um fator que pode ser limitante ao crescimento. Entretanto o intervalo de valor de pH entre 5 e 6 favorece o desenvolvimento celular, seguido de uma fase estacionária relativamente longa. O efeito do abaixamento do valor de pH no crescimento celular pode ser parcialmente devido à concentração de formas dissociadas e não dissociadas de ácido lático no caldo (Biswas et. al. 1996).

De Vuyst e Vandamme (1994) utilizaram meio de cultivo com sistema tamponado contendo acetato, citrato e fosfato, com pH 5,9 a 6,1 aumentaram o rendimento de nisina em cerca de 10 vezes (160 a 1700 UI/mL). A presença de fosfato de potássio bibásico foi sugerida em nosso estudo como essencial na formulação do meio para obtenção de concentrações maiores de nisina devido às suas propriedades como agente tamponante, assim como fonte de íons fosfato os quais são necessários para o desenvolvimento celular. De Vuyst e Vandamme (1992), formularam um meio

complexo consistindo de sacarose (1%), peptona (1%), extrato de levedura (1,0%) , fosfato dihidrogeno de potássio (1%), cloreto de sódio (0,2%), sulfato de magnésio (0.02%), obtendo concentrações de nisina na ordem de 2000 UI/mL

A produção de nisina acompanha a produção de biomassa, o que indica tratar-se de processo fermentativo ligado ao metabolismo primário. Os títulos mais elevados de nisina ocorrem ao se atingir o fim da fase exponencial, que corresponde com a concentração máxima de biomassa (Vandamme, 1992)

Dentre os principais insumos produzidos por metabolismo primário estão os lipossacárides, ácidos orgânicos, proteínas, enzimas e peptídeos os quais incluem as bacteriocinas. O metabolismo primário está ligado à síntese de moléculas e obtenção de energia, associados ao crescimento celular nos microrganismos. A produção de nisina, sendo associada ao crescimento celular, requer utilização do metabolismo energético consumindo compostos de carbono e de fósforo assim como nitrogênio os quais estão vinculados. Isto é um indício da necessidade de associação entre os nutrientes testados pois estão ligados a um mesmo processo de crescimento celular ligado à produção do antibiótico. De fato obtivemos grande correlação entre a ação dos quatro fatores na produção da nisina nos meios de cultivo testados indicando que os mesmos agem em conjunto, porém em proporções definidas e equilibradas.

VanDamme e col. (1991) descreveram a influência da fonte de fósforo no crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* para produção de nisina. Concluíram que a adição de fosfato inorgânico é importante para aumento da concentração de nisina final e ao crescimento celular.

A utilização da sacarose é indicada por ser de regulação da síntese da pré-nisina regulada geneticamente por mecanismo de tipo “operon”. Sacarose também é facilmente metabolizada em bactérias como fonte de energia.

Pirt et al. (1972) propuseram que o consumo de carbono está associado ao consumo de nitrogênio em conjunto de maneira que diversas fontes tais como aminoácidos, peptídeos e outras seriam de interesse para a produção. Alguns aminoácidos não são indicados por competirem entre si por uma mesma proteína de membrana para transporte intracelular. Tal dificuldade não ocorre com o aminoácido asparagina.

Kim et al. (1997) demonstraram a importância da utilização de fontes de carbono adequadas e como sua depleção pode influenciar a produção de nisina. A sacarose aparece como tendo importância particular, Vandamme et al. (1992) propuseram que este açúcar poderia ter controle mais importante no mecanismo genético de expressão da bacteriocina. Uma ligação entre a capacidade de fermentação da sacarose e produção de nisina que estão ligados a um mesmo local de regulação gênica. A secreção da nisina madura, por ser um evento pós-translacional, demonstra a

complexidade do processo. Acredita-se que grande parte da nisina secretada para fora da membrana celular de *Lactococcus lactis* fique adsorvida em pHs próximos de 6-7 (pH de inicial de processo). Foi proposto em nosso trabalho que o agente tensoativo Tween 80 poderia ajudar a liberar da membrana parte da bacteriocina.

De Vuyst e Vandamme (1992) estudaram a influência da fonte de fósforo e de nitrogênio em processo descontínuo para produção de nisina, detectaram que a utilização de dihidrogeno fosfato de potássio exercia um importante papel de aumento da produção da nisina duplicando-a quando usando concentrações crescentes até 5 %. Fontes alternativas de nitrogênio tais como uso de aminoácidos, óleo de semente de algodão e outros foram testados e concluiu-se que, a produção da nisina pode ser afetada pela natureza da fonte de carbono e de nitrogênio.

5.5 – Análise de Regressão Linear Múltipla.

A partir dos resultados do grupo 2, que levaram aos máximos de produtividade (ensaio 9,11 e 19), procedeu-se à regressão múltipla e análise estatística, agrupando os ensaios de #9 a #24 (tabela 19) , obtendo-se equação de correlação entre os fatores adicionados no meio MRS modificado e a produção máxima de nisina

(Log₁₀AU/mL). A saída de regressão abaixo foi realizada através do pacote estatístico – Statgraphics Plus versão 3

Tabela 05 – Dados da regressão Múltipla.

Parâmetros de Regressão:

Variável dependente: LOGPOT

Parâmetro	Coefficiente	Erro	t- estatístico	Valor P
	Estimado	Padrão		
CONSTANTE	1,98905	0,283531	7,01531	0,0001
ASN	-0,213558	0,061078	-3,49647	0,0068
FOS	1,80028	0,272124	6,61565	0,0001
TWN	-1,40776	0,291638	-4,82709	0,0009
SAC*FOS	0,35936	0,061078	5,88361	0,0002
SAC*ASN	0,23436	0,061078	3,83705	0,0040
FOS*TWN	1,47217	0,287097	5,12777	0,0006

5.6 - Análise de Variância do modelo.

Fonte	Soma dos quadrados	Df	Quadrado médio	F-Ratio	Valor P
Modelo	7,16726	6	1,19454	37,74	0,0000
Residual	0,284894	9	0,0316549		
Total (Corr.)	7,45215	15			

R-quadrado= 96,177 %

R- quadrado (ajustado pelos graus de liberdade) = 93,6284 %

Erro padrão da estimativa = 0,177918

Media de erro absoluto = 0,111038

Valor de Durbin-Watson estatístico = 1,32312

5.7 - Resultados da análise estatística

Os resultados da análise mostram a adequação de uma equação de regressão linear múltipla, que descreve a relação entre LOG POT e seis variáveis independente. A equação do modelo adequado foi:

$$\text{LOGPOT} = 1,98905 - 0,213558 \cdot \text{ASN} + 1,80028 \cdot \text{FOS} - 1,40776 \cdot \text{TWN} + 0,35936 \cdot \text{SAC} \cdot \text{FOS} + 0,23436 \cdot \text{SAC} \cdot \text{ASN} + 1,47217 \cdot \text{FOS} \cdot \text{TWN}$$

Desde que o valor P na tabela de análise de variância (ANOVA) é menor que 0,01, há uma significância estatística entre as variáveis com um nível de confiança de 99%.

O valor de R-quadrado estatístico indica que o modelo adequado explica em 96,177% da variabilidade em LOGPOT. O valor de R-quadrado ajustado, estatisticamente, mais aceitável em comparação de modelos com diferentes números de variáveis independente é de 93,6284%. O erro padrão dos valores estimados mostram o desvio padrão dos valores residuais de 0,177918.

O valor de media absoluta (MAE) de 0,111038 é o valor médio dos residuais. O teste estatístico do valor de Durbin-Watson (DW) dos residuais determina se há alguma correlação significativa baseada na ordem das quais os mesmos ocorrem no arquivo de dados de ensaios. Desde que o valor DW é menor que 1,4, há alguma indicação de séria correlação entre os dados. O gráfico dos residuais contra a ordem nos dados para verificação se existe algum padrão detectável.

Na determinação de como o modelo pode ser simplificado, verificamos que o maior valor de P sobre as variáveis independentes é 0,0068, pertencendo à influência da

variável ASN. Desde que valor-P é menor que 0,01 – o mais alto termo é estatisticamente significativo em 99% de nível de confiança.

Conseqüentemente, provavelmente não seria necessário remover nenhuma das variáveis do modelo.

5.8 - Teste de Hipótese.

Esta análise mostra os resultados de um teste de hipótese relacionados à media (r) de uma distribuição normal das variáveis da regressão múltipla. As duas hipóteses testadas foram:

Hipótese nula: $r = 0,5$

Hipótese alternativa: r diferente de 0,5

Dada uma amostragem de 100 observações com media de 0,0 e um desvio de erro padrão 1,0, o valor de t - estatístico é igual a -5,0. Desde que valor P para o teste é menor que 0,05, a hipótese nula é rejeitada com 95,0% de nível de confiança. Ou seja, é validado o processo de regressão múltipla.

Resultados do Teste (Statgraphics Plus v.3):

Média das amostras = 0,0

Desvio padrão da amostra = 1,0

Tamanho da amostragem = 100

Considerados 95,0% de intervalo para média: $0,0 \pm 0,198422$

Hipótese nula: média = 0,5

Alternativa: não igual.

t-statístico computado = -5,0

P-Value = 0,00000265129

Rejeição da hipótese nula para $\alpha = 0,05$.

Tabela 5 – Valores codificados e valores reais utilizados na regressão múltipla.

Ensaio	SACc	SAC (g/L)	ASNc	ASN (g/L)	FOSc	FOS (g/L)	TWNc	TWN (g/L)	Log P
9	+1	12,5	+1	75	+1	18	+1	6,6	4,22375
10	+1	12,5	+1	75	-1	6	-0,607	2,1	1,59875
11	+1	12,5	+1	75	+1	18	-0,607	2,1	4,18208
12	-1	5	-1	7,5	-1	6	-1	1	3,89042
13	+1	12,5	-1	7,5	-1	6	-1	1	2,89042
14	-1	5	+1	75	-1	6	-1	1	2,84875
15	+1	12,5	+1	75	-1	6	-1	1	2,59875
16	-1	5	-1	7,5	+1	18	-1	1	3,68208
17	+1	12,5	-1	7,5	+1	18	-1	1	3,93208
18	-1	5	+1	75	+1	18	-1	1	2,93208
19	+1	12,5	+1	75	+1	18	-1	1	4,26542
20	0	8,75	0	41,25	0	12	-1	1	3,59875
21	0	8,75	0	41,25	0	12	-1	1	3,64042
22	0	8,75	0	41,25	0	12	-1	1	3,22375
23	0	8,75	0	41,25	0	12	-1	1	3,30708
24	0	8,75	0	41,25	0	12	-1	1	3,30708

Figura 11 – Gráfico relacionando LOG POT- valores observados (valores experimentais) em função de LOG POT – valores estimados (previstos pela análise de regressão)

Tabela 08- Parâmetros de processo para o grupo SAC (adição sacarose 5,0 g/L).

Ensaio	T (h)	pH	Massa		Halo (cm)	NISINA (AU/mL)	Log10 AU	AU/mg CEL (AU/mg)	Nisina (mg/L)	P (AU/mL.h)	Prod (mg/L.h)	Pnis (mg/mg)
			Abs	celular (X) (Mg/L)								
SAC 1	0	6,55	0,29	$1,25 \times 10^2$	0,74	$7,77 \times 10^{-2}$	-1,110	0,001	0,02	0,037	0,00026	$1,55 \times 10^{-4}$
	6	6,4	0,33	$1,43 \times 10^2$	0,85	$2,23 \times 10^{-1}$	-0,651	0,002	0,06	0,205	0,00114	$3,89 \times 10^{-4}$
	12	6,12	0,41	$1,80 \times 10^2$	1,1	$2,46 \times 10^0$	0,390	0,014	0,61	0,951	0,00398	$3,42 \times 10^{-3}$
	16	5,81	0,54	$2,39 \times 10^2$	1,29	$1,52 \times 10^1$	1,182	0,064	3,80	0,697	0,00198	$1,59 \times 10^{-2}$
	24	5,5	0,79	$3,53 \times 10^2$	1,3	$1,67 \times 10^1$	1,224	0,047	4,18	0,634	0,00128	$1,19 \times 10^{-2}$
	32	5,25	1,1	$4,93 \times 10^2$	1,32	$2,03 \times 10^1$	1,307	0,041	5,07	0,620	0,00114	$1,03 \times 10^{-2}$
	36	5,15	1,21	$5,43 \times 10^2$	1,33	$2,23 \times 10^2$	1,349	0,041	5,58			
SAC 2	0	6,75	0,3	$1,30 \times 10^2$	0,75	$8,55 \times 10^{-2}$	-1,068	0,001	0,02	0,099	0,00067	$1,65 \times 10^{-4}$
	4	6,5	0,34	$1,48 \times 10^2$	0,91	$3,97 \times 10^{-1}$	-0,401	0,003	0,10	0,331	0,00163	$6,71 \times 10^{-4}$
	12	6,24	0,46	$2,03 \times 10^2$	1,15	$3,97 \times 10^0$	0,599	0,020	0,99	1,861	0,00711	$4,90 \times 10^{-3}$
	16	5,9	0,59	$2,62 \times 10^2$	1,36	$2,98 \times 10^1$	1,474	0,114	7,44	2,672	0,00730	$2,84 \times 10^{-3}$
	24	5,55	0,82	$3,66 \times 10^2$	1,44	$6,41 \times 10^1$	1,807	0,175	16,03	2,428	0,00447	$4,38 \times 10^{-3}$
	32	5,32	1,21	$5,43 \times 10^2$	1,46	$7,77 \times 10^1$	1,890	0,143	19,42	1,961	0,00333	$3,57 \times 10^{-2}$
	36	5,22	1,31	$5,89 \times 10^2$	1,45	$7,06 \times 10^1$	1,849	0,120	17,65			$3,00 \times 10^2$
SAC 3	0	6,6	0,31	$1,34 \times 10^2$	0,84	$2,03 \times 10^{-1}$	-0,693	0,002	0,05	0,214	0,00132	$3,77 \times 10^{-4}$
	4	6,49	0,37	$1,62 \times 10^2$	0,99	$8,55 \times 10^{-1}$	-0,068	0,005	0,21	0,713	0,00316	$1,32 \times 10^{-4}$
	12	6,2	0,51	$2,25 \times 10^2$	1,23	$8,55 \times 10^0$	0,932	0,038	2,14	2,481	0,00932	$9,49 \times 10^{-3}$
	16	5,84	0,6	$2,66 \times 10^2$	1,39	$3,97 \times 10^1$	1,599	0,149	9,92	5,230	0,01345	$3,73 \times 10^{-2}$
	24	5,62	0,87	$3,89 \times 10^2$	1,51	$1,26 \times 10^2$	2,099	0,323	31,38	8,451	0,01530	$8,07 \times 10^{-2}$
	32	5,4	1,23	$5,53 \times 10^2$	1,59	$2,70 \times 10^2$	2,432	0,489	67,61	9,747	0,01559	$1,22 \times 10^{-1}$
	37	5,15	1,39	$6,25 \times 10^2$	1,62	$3,61 \times 10^2$	2,557	0,577	90,16			$1,44 \times 10^{-1}$
SAC 4	0	6,75	0,39	$1,71 \times 10^2$	0,91	$3,97 \times 10^{-1}$	-0,401	0,002	0,10	0,380	0,00192	$5,81 \times 10^{-4}$
	4	6,39	0,45	$1,98 \times 10^2$	1,05	$1,52 \times 10^0$	0,182	0,008	0,38	1,267	0,00446	$1,92 \times 10^{-3}$
	12	6,15	0,64	$2,84 \times 10^2$	1,29	$1,52 \times 10^1$	1,182	0,053	3,80	3,773	0,00993	$1,34 \times 10^{-2}$
	17	5,75	0,85	$3,80 \times 10^2$	1,44	$6,41 \times 10^1$	1,807	0,169	16,03	15,027	0,02886	$4,22 \times 10^{-2}$
	24	5,3	1,16	$5,21 \times 10^2$	1,62	$3,61 \times 10^2$	2,557	0,693	90,16	22,060	0,03960	$1,73 \times 10^{-2}$
	32	5,12	1,24	$5,57 \times 10^2$	1,69	$7,06 \times 10^2$	2,849	1,267	176,48	34,870	0,05307	$3,17 \times 10^{-1}$
	36	4,91	1,46	$6,57 \times 10^2$	1,75	$1,26 \times 10^3$	3,099	1,911	313,83			$4,78 \times 10^{-1}$

Tabela 09- Parâmetros de processo para *Lactococcus lactis* (ensaio iniciais).

Ensaio	pH final	Sac cons. (g/L)	Acido láctico (g/L)	Y _{p/s} (%)	Massa celular (mg/L)	Nisina (AU/mL)	Log ₁₀ AU/mL	μX^2 (h ⁻¹)	AU/mg X (AU/mg)	mg nisina/L	mg nisina/L.h	mg mg nisina/mg X
1	5,80	2,46	4,12	21,23	647,95	1,67 . 10 ⁴	4,22	0,016	25,835	4,184	116,2	6,46
2	6,00	3,39	2,09	11,87	625,23	3,97 . 10 ¹	1,60	0,018	0,063	9,92	0,28	0,02
3	5,81	3,19	4,12	22,89	670,68	1,52 . 10 ⁴	4,18	0,018	22,676	3,802	105,6	5,67
4	5,70	1,94	2,39	40,40	716,14	7,77 . 10 ³	3,89	0,019	3,117	558,07	11,63	0,78
5	5,50	1,69	2,39	11,44	784,32	7,77 . 10 ²	2,89	0,024	1,601	313,83	6,54	0,40
6	5,60	1,94	2,22	37,53	697,95	7,06 . 10 ²	2,85	0,017	1,349	235,34	4,90	0,34
7	5,85	1,61	2,01	9,55	725,23	3,97 . 10 ²	2,60	0,021	0,410	74,42	1,55	0,10
8	5,72	1,21	1,84	25,11	697,95	4,81 . 10 ³	3,68	0,021	3,198	558,07	11,63	0,80
9	5,71	2,12	1,19	5,93	697,95	8,55 . 10 ³	3,93	0,021	0,689	120,23	2,50	0,17
10	5,92	1,91	2,21	36,99	611,59	8,55 . 10 ²	2,93	0,019	0,105	16,03	0,33	0,03
11	5,31	1,65	3,11	14,83	647,95	1,84 . 10 ⁴	4,27	0,018	23,471	3,802	79,21	5,87
12	5,15	1,91	3,24	24,50	584,32	3,97 . 10 ³	3,60	0,010	5,607	819,14	17,07	1,40

Tabela 10 - Resultados de processo para os 30 ensaios realizados, referentes aos grupos do planejamento.

Ensaio	pH	Ac. Lático (g/L)	X (mg/L)	Nisina AU/mL	Log AU	μX h^{-1}	AU/mg X^4	Yp/s (%)	Sacarose (g/L)	S-So (g/L)	mg Nis/L	Prod mg/l.h	mgNis/ mg X
1	5,65	2,15	557,05	126	2,10	0,401	0,225	112,33	1,01	0,99	31,38	0,87	0,06
2	5,61	3,21	588,86	298	2,47	0,040	0,506	43,13	1,15	3,85	74,42	2,07	0,13
3	5,80	2,44	538,86	167	2,22	0,035	0,311	73,81	0,29	1,71	41,85	1,16	0,08
4	5,40	3,12	684,32	4810	3,68	0,054	7,028	37,10	0,65	4,35	1.202	33,40	1,76
5	5,80	1,29	447,95	3,97	0,60	0,036	0,009	78,50	1,15	0,85	0,99	0,03	0,00
6	5,90	3,15	429,77	1260	3,10	0,049	2,921	52,56	1,90	3,1	313,83	8,72	0,73
7	5,50	1,05	502,50	18,4	1,27	0,036	0,037	32,52	0,33	1,67	4,61	0,13	0,01
8	5,71	2,65	620,68	7770	3,89	0,018	12,518	33,84	0,95	4,05	1942	53,96	3,13
9	5,80	4,12	647,95	16700	4,22	0,016	25,835	21,23	2,46	10,04	4184	116,2	6,46
10	6,00	2,09	625,23	3,97	1,60	0,018	0,063	11,87	3,39	9,11	9,92	0,28	0,02
11	5,81	4,12	670,68	15200	4,18	0,018	22,676	22,89	3,19	9,31	3802	105,6	5,67
12	5,70	2,39	716,14	7770	3,89	0,019	3,117	40,40	1,94	3,06	558,07	11,63	0,78
13	5,50	2,39	784,32	77	2,89	0,024	1,601	11,44	1,69	10,81	313,83	6,54	0,40

14	5,60	2,22	697,95	70,6	2,85	0,017	1,349	37,53	1,94	3,06	235,34	4,90	0,34
15	5,85	2,01	725,23	39,7	2,60	0,021	0,410	9,55	1,61	10,89	74,42	1,55	0,10
16	5,72	1,84	697,95	4810	3,68	0,021	3,198	25,11	1,21	3,79	558,07	11,63	0,80
17	5,71	1,19	697,95	8550	3,93	0,021	0,689	5,93	2,12	10,38	120,23	2,50	0,17
18	5,92	2,21	611,59	85,5	2,93	0,019	0,105	36,99	1,91	3,09	16,03	0,33	0,03
19	5,31	3,11	647,95	18400	4,27	0,018	23,471	14,83	1,65	10,85	3802	79,21	5,87
20	5,15	3,24	584,32	3970	3,60	0,010	5,607	24,50	1,91	6,84	819,14	17,07	1,40
21	5,17	3,12	584,32	4370	3,64	0,017	5,607	24,45	2,15	6,60	819,14	17,07	1,40
22	5,10	3,19	570,68	1670	3,22	0,007	3,554	24,41	1,99	6,76	507,02	10,56	0,89
23	5,55	2,44	638,86	2030	3,31	0,015	3,174	23,11	3,29	5,46	507,02	10,56	0,79
24	5,50	2,12	666,14	2030	3,31	0,016	1,884	19,58	3,15	5,6	313,83	6,54	0,47
25	5,40	3,95	629,77	2980	3,47	0,015	3,545	127,69	0,65	1,55	558,07	11,63	0,89
26	5,50	4,44	647,95	5290	3,72	0,015	5,057	18,30	2,45	12,55	819,14	17,07	1,26
27	5,05	4,12	629,77	2030	3,31	0,015	1,993	39,03	3,29	5,46	313,83	6,54	0,50
28	5,20	4,39	652,50	8550	3,93	0,024	13,107	44,44	3,64	5,11	2138	44,54	3,28
29	4,95	4,04	657,05	481	2,68	0,012	0,732	37,32	3,15	5,60	120,23	2,50	0,18
30	5,15	4,19	625,23	777	2,89	0,010	1,243	41,20	3,49	5,26	194,25	4,05	0,31

Tabela 11 - Análises de regressão múltipla, equação 01 - (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais (Statgraphics Plus) :

$$\text{LOG AU/mL} = 1,98905 - 0,21355 \text{ ASN} + 1,80028 \text{ FOS} - 1,4076 \text{ TWN} + 0,35936 \text{ SAC FOS} + 0,23436 \text{ SAC ASN} + 1,47217 \text{ FOS TWN}$$

Fator	Equação (Log AU/mL)	Condição	Log AU/mL
Equação 1			
X1= +1	LOG AU/mL=2,0098+2,1596*FOS-	X3= +1 X4= +1	4,23
X2= +1	1,40776*TWN+1,47217*FOS*TWN	X3= -1 X4= -1	2,73
		X3= -1 X4= +1	-3,03
		X3= +1 X4= -1	4,10

Figura 12- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 1.

Tabela 12 - Análises de regressão múltipla, equação 02 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais (Statgraphics Plus) :

LOG AU/ML = 1,98905 - 0,21355 ASN + 1,80028 FOS - 1,4076 TWN + 0,35936 SAC FOS + 0,23436 SAC ASN + 1,47217 FOS TWN

Fator	Equação (Log AU/mL)	Condição	Log AU/mL
Equação 2			
X1= -1	LOG AU/mL=2,4369+1,4437*FOS-	X3= +1 X4= +1	3,94
X2= -1	1,40776*TWN+1,47217*FOS*TWN	X3= -1 X4= -1	3,87
		X3= -1 X4= +1	-1,88
		X3= +1 X4= -1	3,81

Figura 13 - Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 2.

Tabela 13 - Análises de regressão múltipla, equação 03 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais (Statgraphics Plus) :

$$\text{LOG AU/ML} = 1,98905 - 0,21355 \text{ ASN} + 1,80028 \text{ FOS} - 1,4076 \text{ TWN} + 0,35936 \text{ SAC FOS} + 0,23436 \text{ SAC ASN} + 1,47217 \text{ FOS TWN}$$

Fator	Equação (Log AU/mL)	Condição	Log AU/mL
-------	---------------------	----------	-----------

Equação 3

X1= +1	LOG AU/mL=1,9682+2,1596*FOS-	X3= +1 X4= +1	4,19
X2= -1	1,40776*TWN+1,47217*FOS*TWN	X3= -1 X4= -1	2,69
		X3= -1 X4= +1	-3,07
		X3= +1 X4= -1	4,06

FIX: X1 (SAC)= +1; X2 (ASN)= -1

$$\text{LOG AU/mL} = 1,9682 + 2,1596 \cdot \text{FOS} - 1,40776 \cdot \text{TWN} + 1,47217 \cdot \text{FOS} \cdot \text{TWN}$$

Figura 14 - Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 3.

Tabela 14 - Análises de regressão múltipla, equação 04 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais (Statgraphics Plus) :

$$\text{LOG AU/ML} = 1,98905 - 0,21355 \text{ ASN} + 1,80028 \text{ FOS} - 1,4076 \text{ TWN} + 0,35936 \text{ SAC FOS} + 0,23436 \text{ SAC ASN} + 1,47217 \text{ FOS TWN}$$

Fator	Equação (Log AU/mL)	Condição	Log AU/mL
Equação 4			
X1= -1	LOG AU/mL=1,4161+1,4409*FOS-1,40776*TWN+1,47217*FOS*TWN	X3= +1 X4= +1	2,92
X2= +1		X3= -1 X4= -1	3,41
		X3= -1 X4= +1	-2,38
		X3= +1 X4= -1	3,34

FIX: X1 (SAC)= -1; X2 (ASN)= +1

$$\text{LOG AU/mL} = 1,41614 + 1,4409 \text{ FOS} - 1,40776 \text{ TWN} + 1,47217 \text{ FOS} \text{ TWN}$$

Figura 15 - Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 4.

Tabela 15 - Análises de regressão múltipla, equação 05 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais (Statgraphics Plus) :

$$\text{LOG AU/ML} = 1,98905 - 0,21355 \text{ ASN} + 1,80028 \text{ FOS} - 1,4076 \text{ TWN} + 0,35936 \text{ SAC FOS} + 0,23436 \text{ SAC ASN} + 1,47217 \text{ FOS TWN}$$

Fator	Equação (Log AU/mL)	Condição	Log AU/mL
Equação 5			
X3= +1	LOG AU/mL=3,8537-0,2136*ASN+	X1= +1 X2= +1	4,23
X4= +1	0,3594*SAC+0,2344*SAC*ASN	X1= -1 X2= -1	3,94
		X1= -1 X2= +1	3,04
		X1= +1 X2= -1	4,19

FIXADOS: X3 (FOS)= +1; X4 (TWN)= +1

$$\text{LOG AU/mL} = 3,8537 - 0,21355 * \text{ASN} + 0,35936 * \text{SAC} + 0,23436 * \text{SAC} * \text{ASN}$$

Figura 16 - Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 5.

Tabela 16 - Análises de regressão múltipla, equação 06 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais (Statgraphics Plus) :

$$\text{LOG AU/ML} = 1,98905 - 0,21355 \text{ ASN} + 1,80028 \text{ FOS} - 1,4076 \text{ TWN} + 0,35936 \text{ SAC FOS} + 0,23436 \text{ SAC ASN} + 1,47217 \text{ FOS TWN}$$

Fator	Equação (Log AU/mL)	Condição	Log AU/mL
Equação 6			
X3= -1	LOG AU/mL=3,0687-0,2136*ASN-	X1= +1 X2= +1	2,73
X4= -1	0,3594*SAC+0,2344*SAC*ASN	X1= -1 X2= -1	3,87
		X1= -1 X2= +1	2,98
		X1= +1 X2= -1	2,68

Figura 17- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 6.

Tabela 17 - Análises de regressão múltipla, equação 07 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais (Statgraphics Plus) :

$$\text{LOG AU/ML} = 1,98905 - 0,21355 \text{ ASN} + 1,80028 \text{ FOS} - 1,4076 \text{ TWN} + 0,35936 \text{ SAC FOS} + 0,23436 \text{ SAC ASN} + 1,47217 \text{ FOS TWN}$$

Fator	Equação (Log AU/mL)	Condição	Log AU/mL
Equação 7			
X3= +1	LOG AU/mL=3,7249-0,2136*ASN+	X1= +1 X2= +1	4,10
X4= -1	0,3594*SAC+0,2344*SAC*ASN	X1= -1 X2= -1	3,81
		X1= -1 X2= +1	2,91
		X1= +1 X2= -1	2,68

FIXADOS: X3 (FOS)= +1; X4 (TWN)= -1
 $\text{LOG AU/mL} = 3,7249 - 0,21355 \cdot \text{ASN} + 0,35936 \cdot \text{SAC} + 0,23436 \cdot \text{SAC} \cdot \text{ASN}$

Figura 18- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – equação 7.

Tabela 18 - Análises de regressão múltipla, equação 08 (ensaios 9 a 24) deram origem às seguintes equações principais (Statgraphics Plus) :

$$\text{LOG AU/ML} = 1,98905 - 0,21355 \text{ ASN} + 1,80028 \text{ FOS} - 1,4076 \text{ TWN} + 0,35936 \text{ SAC FOS} + 0,23436 \text{ SAC ASN} + 1,47217 \text{ FOS TWN}$$

Fator	Equação (Log AU/mL)	Condição	Log AU/mL
Equação 8			
X3= -1	LOG AU/mL=-2,6909-0,2136*ASN-	X1= +1 X2= +1	-3,03
X4= +1	0,3594*SAC+0,2344*SAC*ASN	X1= -1 X2= -1	-1,88
		X1= -1 X2= +1	-3,07
		X1= +1 X2= -1	-2,78

FIXADOS: X3 (FOS)= -1; X4 (TWN)= +1
 $\text{LOG AU/mL} = -2,6909 - 0,21355 \cdot \text{ASN} - 0,35936 \cdot \text{SAC} + 0,23436 \cdot \text{SAC} \cdot \text{ASN}$

Figura 19- Gráficos de superfície e de contorno relativos à análise de regressão múltipla – Equação 8.

5.9 – Proporções entre os nutrientes (fatores).

Procuramos, a partir dos dados das equações de regressão, obter relações entre nutrientes que levaram à produção máxima de nisina, para as concentrações de sacarose em +1 e asparagina = +1, na equação 1, obtivemos potencia máxima (4,0 Log₁₀ AU/mL) de nisina considerando fosfato em concentração máxima, e independentemente do Tween em nível positivo ou negativo (tabela 11).

Para as concentrações de sacarose = -1 e asparagina = -1, (tabela 12, equação 2) observou-se equivalência quanto à produção de nisina ($2,7 \times 10^3$ AU/mL) ao serem fixados fosfato em concentração mínima ou máxima. Porém, o Tween deve ser mantido em concentração mínima quando o fosfato estiver também em concentração mínima. Nesta situação, as relações C/N, C/P, e N/P foram respectivamente 0,67, 0,27 e 0,41. Comparativamente àquelas relações adotadas como ótimas, essas proporções foram: quatro vezes maior para C/N; 2,5 vezes menores para C/P; e 10 vezes menores para N/P. Na concentração máxima, fosfato estava em excesso em relação aos outros nutrientes.

Porém não verificamos inibição da produção de nisina, que resultou na ordem de 10^3 AU/mL, quando nitrogênio se mostrou fator limitante em relação a sacarose e ao fosfato, independente da concentração de Tween. O ensaio #16 confirma presença de nisina de 3,6821 log₁₀ AU/mL. (tabela 19)

Observou-se que, para fosfato ao nível mínimo e Tween ao nível máximo, embora as relações entre os nutrientes se mantivessem constantes, a produção de nisina não foi detectada, confirmando haver uma dependência do fosfato em relação ao Tween quando sacarose e asparagina são mantidas em níveis mínimos.

Fixando-se as concentrações de sacarose em seu nível máximo e asparagina em nível mínimo (tabela 13, equação 3), para fosfato em concentração máxima, independentemente da concentração de Tween, a produção de nisina foi igualmente máxima, média de $1,0 \times 10^4$ AU/mL para as seguintes relações entre os nutrientes: $C/N=1,7$; $C/P=0,69$ e $N/P=0,42$. Observa-se que a relação C/P manteve-se constante em relação ao gráfico 1, embora a razão C/N fosse 10 vezes maior; e a relação N/P , 10 vezes menor. A proporção entre C/P mostrou-se determinante na produção de nisina pois a fonte de carbono é indispensável ao desenvolvimento celular. Porém origina ácido láctico que por sua vez é neutralizado pelo fosfato de potássio, que mantém o meio tamponado e em pH favorável ao desenvolvimento bacteriano e conseqüente produção de nisina. A proporção C/P mostrou-se como sendo a relação mais importante na formação de células secretoras de nisina, para as condições dos ensaios realizados. Para a variação de asparagina entre -1 e $+1$. Para sacarose mantida em $+1$, obtiveram-se produções de nisina em torno de $4,0 \log_{10} \text{AU/mL}$.

Para os limites de sacarose utilizados, aparentemente, a asparagina se comporta como nutriente em excesso no meio, ou seja, para proporções $C/N = 0,167$ e $C/N = 1,67$ o resultado para nisina é máximo.

Mantendo-se a concentração de sacarose e asparagina em seu nível máximo, verificamos que (tabela 14, equação 4), para fosfato em concentrações máximas ou mínimas, e Tween em concentrações máximas, as razões entre nutrientes foram: C/N de 0,067, C/P variou de 0,28 a 0,83, e N/P variou de 4,17-12,50, sendo o nível máximo de nisina atingido de $3,4 \log_{10} \text{AU/mL}$. A relação C/N foi a razão limitante, embora as demais relações fossem favoráveis.

As análises dos gráficos demonstraram que as proporções entre nutrientes que contribuíram favoravelmente para a obtenção de melhores valores de nisina, em média em torno de $4,0 \log_{10} \text{AU/mL}$, foram: (i) $C/N = 1,7$; $C/P = 0,69$; $N/P = 0,42$, e (ii) $C/N = 1,7$; $C/P = 0,69$; $N/P = 4,6$. Verificou-se que para C/P constante, houve uma variação em 10 vezes das outras duas razões. Os ensaios onde estas proporções foram atingidas e que apresentaram respectivamente valores máximos de nisina foram: 09 e $4,22 \log_{10} \text{AU/mL}$; 11 e $4,182 \log_{10} \text{AU/mL}$, 19 e $4,26 \log_{10} \text{AU/mL}$.

Para proporções de nutrientes em intervalos intermediários, quais sejam: $0,17 < C/N < 1,7$ e $0,42 < N/P < 4,16$, mantendo-se em uma faixa mais estreita, onde os extremos duas vezes entre si, $0,69 < C/P < 1,61$, os valores de nisina atingiram valores da ordem de $2,0-3,9 \log_{10} \text{AU/mL}$.

Aplicando a proporção C/N abaixo de 0,1 levam a valores muito baixos de potência. No entanto para a variação de asparagina entre -1 e $+1$, para sacarose fixa em $+1$, obtivemos $\log P = 4,0$. (Para os limites de sacarose utilizados)

A proporção de utilização da fonte de carbono - sacarose com os outros nutrientes foi estudada, a proporção de C/N em torno de 6,0 em massa e C/P em torno de 0,6 levou a ótimos rendimentos de nisina. A sacarose como se sabe age como reguladora da produção de nisina. Outros elevados valores de proporção de C/N e C/P não obtiveram tanto sucesso como nas proporções citadas. Assim é perceptível que existe um ponto ideal de proporção entre os nutrientes que leva à uma produção ideal da nisina. A proporção destes nutrientes foi avaliada estatisticamente por processo de regressão múltipla. Os resultados demonstraram que, tão importante quanto os nutrientes utilizados é a proporção que leva ao melhor meio de fermentação analisado. A proporção C/N e C/P parecem ser fundamentais.

Para as situações em que o fosfato está em máxima concentração e o Tween variando em seus extremos, o Log P foi máximo em torno de 4,2 $\text{Log}_{10}\text{AU/mL}$. Observou-se através disso, que as melhores relações entre os nutrientes para atingir essa produção fora: $\text{C/N} = 0,17$; $\text{C/P} = 0,69$ e $\text{N/P} = 4,17$.

A análise da equação 5 demonstra que a proporção de C/N deve estar na faixa de 0,17. A relação C/N abaixo de 0,1 leva a valores muito baixos de $\log P$, no entanto Para a variação de ASN entre -1 e $+1$ para sacarose fixa em $+1$ obtivemos

$\log P = 4,0$, para os limites de sacarose utilizados aparentemente a asparagina se comporta como nutriente em excesso no meio, ou seja, para quaisquer proporções na faixa $C/N > 0,167$ e $C/N < 1,67$ o resultado é máximo de potência de nisina. Na faixa de nutrientes analisada verifica-se, então, que a relação entre C/N é independente quando analisada individualmente. Porém quando analisada em carência de fósforo (tabela 16, equação 6) fixados $X_3 = -1$ (fosfato) e $X_4 = -1$ (Tween) ocorre sensível diferença de comportamento. Com a diminuição simultânea de asparagina e sacarose temos aumento de $\log P$. A proporção de nutriente para o ponto de máximo neste gráfico é: $C/N = 0,67$ e $C/P = 2,08$ proporções intermediárias às ideais, levando a produção de $\log P = 3,87$. Na tabela 17, equação 7 observa-se o efeito de fosfato como nutriente limitante naquela condição. Verificamos que, fixando os valores de sacarose e asparagina em seus níveis máximos, o valor de $\log P$ permanece alto (próximo de 4,0). Concluímos então que o fosfato poderia em sua condição mínima (-1) ser limitante ao processo e em concentração adequada (tabela 17, equação 7).

Nas condições de sacarose e asparagina em níveis máximos (tabela 11, equação 1) se o fosfato for mantido em valor máximo, independentemente do Tween ser mínimo ou máximo, a produção de nisina foi máxima, equivalente a 10^4 AU/mL. Observou-se que as melhores relações entre os nutrientes foram: $C/N = 0,17$; $C/P = 0,69$; $N/P = 4,17$, ao atingir estes níveis de produção. Ao serem fixados

sacarose = -1 e asparagina = -1, (tabela 12, equação 2) observou-se equivalência quanto a produção de nisina em $2,7 \times 10^3$ ao ser fixados fosfato em concentração mínima ou máxima. Porém, o Tween deve ser mantido na concentração mínima quando fosfato estiver também em concentração mínima. Nesta situação, para fosfato e Tween em concentrações máximas ou mínimas, as relações C/N, C/P, e N/P foram respectivamente 0,67, 0,27 e 0,41. Diferenciaram das relações ótimas para C/N quatro vezes maior; para C/P em 2,5 vezes menor; e para N/P, em 10 vezes menor. Observou-se que para fosfato ao nível mínimo e Tween ao nível máximo, embora as relações entre os nutrientes fossem as mesmas, a produção de nisina não é possível ser detectada, mostrando haver uma dependência do fosfato em relação ao Tween quando sacarose e asparagina são mantidos em meios mínimos. Fixando-se as concentrações de sacarose em +1 e asparagina em -1, para fosfato também em concentração máxima, independentemente da concentração de Tween, a produção de nisina foi igualmente máxima, média de 4,0 $\text{Log}_{10}\text{AU/mL}$, para as relações entre os nutrientes otimizados de C/N=1,7; C/P=0,69 e N/P=0,42, observou-se que a relação C/P manteve-se constante em relação ao gráfico 1. A proporção entre C/P mostrou-se determinante na produção de nisina pois a fonte de

A proporção de utilização da fonte de carbono - sacarose com os outros nutrientes foi estudada, a proporção de C/N em torno de 6,00 em massa e C/P em torno de 0,6 leva a excelentes rendimentos de nisina. A sacarose como se sabe age

como reguladora da produção de nisina. Valores maiores da proporção C/N e C/P não obtiveram tanto sucesso como nas proporções citadas. Assim, verificamos que existe certas proporções entre os nutrientes, que levam à uma produção otimizada de nisina. A influencia de cada um destes nutrientes foi avaliada estatisticamente por processo de regressão multiparamétrica.

Uma análise preliminar indica que, tão importante quanto os nutrientes utilizados, é a proporção que leva ao melhor meio de fermentação analisado. A proporção C/N e C/P assim como a presença de Tween 80 no meio parecem ser fundamentais.

Analisando os dados da tabela 19 pudemos verificar que existe uma grande correlação entre relação $N/C = 6,0$ (ensaio: 9,10,11 e 19) e acima de 9,0 (ensaio: 14,18,21 e 28) desta maneira verificamos que para microrganismo crescendo em processo tipo descontínuo, o nível de nitrogênio está associado à produção de nisina, analogamente verificamos que a proporção P/C deve ser mantida em cerca de 0,83 (ensaio: 2,4,13,15 e 19).

Tabela 19 – Resultados de produção de nisina em função da adição de nutrientes nos grupos de planejamento experimental propostos.

Ensaio	Relação em massa				mg Ns/L	mg Ns/ mg X	P _{media}	AU/ mg X	Y _{s/p} (%)	μX	LOG P
	C/N	NC	C/P	P/C							
1	1,33	0,75	0,67	1,50	31,38	0,056	3,486964	0,2254	112,33	0,401	2,099
2	3,33	0,30	1,67	0,60	74,42	0,126	8,268895	0,5055	43,1258	0,0396	2,474
3	0,13	7,50	0,67	1,50	41,85	0,078	4,649942	0,3106	73,8052	0,0349	2,224
4	0,33	3,00	1,67	0,60	1.202,33	1,757	133,5921	7,0279	37,0987	0,0538	3,682
5	1,33	0,75	0,33	3,00	0,99	0,002	0,110267	0,0089	78,499	0,0355	0,599
6	3,33	0,30	0,83	1,20	313,83	0,730	34,86964	2,9209	52,5584	0,0485	3,099
7	0,13	7,50	0,33	3,00	4,61	0,009	0,511816	0,0367	32,5212	0,0364	1,265
8	0,33	3,00	0,83	1,20	1.942,48	3,130	215,8312	12,518	33,8442	0,0176	3,890
9	0,17	6,00	0,69	1,44	4.184,95	6,459	464,9942	25,835	21,2254	0,0157	4,224
10	0,17	6,00	2,08	0,48	9,92	0,016	1,102675	0,0635	11,8665	0,0183	1,599
11	0,17	6,00	0,69	1,44	3.802,10	5,669	422,4554	22,676	22,8897	0,018	4,182
12	0,67	1,50	0,83	1,20	558,07	0,779	46,50598	3,1171	40,3989	0,0188	3,890
13	1,67	0,60	2,08	0,48	313,83	0,400	26,15223	1,6005	11,4358	0,0238	2,890
14	0,07	15,00	0,83	1,20	235,34	0,337	19,61141	1,3487	37,5254	0,0167	2,849
15	0,17	6,00	2,08	0,48	74,42	0,103	6,201672	0,4105	9,54688	0,0211	2,599
16	0,67	1,50	0,28	3,60	558,07	0,800	46,50598	3,1983	25,1115	0,0206	3,682
17	1,67	0,60	0,69	1,44	120,23	0,172	10,01941	0,6891	5,92984	0,0212	3,932
18	0,07	15,00	0,28	3,60	16,03	0,026	1,33611	0,1049	36,9936	0,0189	2,932
19	0,17	6,00	0,69	1,44	3.802,10	5,868	316,8415	23,471	14,826	0,0182	4,265
20	0,21	4,71	0,73	1,37	819,14	1,402	68,26144	5,6075	24,5009	0,0095	3,599
21	0,21	4,71	0,73	1,37	819,14	1,402	68,26144	5,6075	24,4514	0,0166	3,640
22	0,21	4,71	0,73	1,37	507,02	0,888	42,2515	3,5538	24,4083	0,0073	3,224
23	0,21	4,71	0,73	1,37	507,02	0,794	42,2515	3,1745	23,1148	0,0151	3,307
24	0,21	4,71	0,73	1,37	313,83	0,471	26,15223	1,8845	19,5813	0,0156	3,307
25	0,05	18,75	0,18	5,45	558,07	0,886	46,50598	3,5446	127,694	0,0154	3,474
26	0,36	2,75	1,25	0,80	819,14	1,264	68,26144	5,0568	18,2992	0,015	3,724
27	1,17	0,86	0,73	1,37	313,83	0,498	26,15223	1,9933	39,0299	0,0148	3,307
28	0,09	11,20	0,73	1,37	2.138,08	3,277	178,1731	13,107	44,4362	0,0241	3,932
29	0,21	4,71	1,46	0,69	120,23	0,183	10,01941	0,732	37,3153	0,0116	2,682
30	0,21	4,71	0,40	2,51	194,25	0,311	16,18734	1,2427	41,2023	0,0101	2,890

Na figura 21 observamos o efeito da proporção P/C, para valores próximos de 0,83. Temos uma maior correlação com os valores de máximo de produção da nisina (Log P próximo de 4,0).

Para os ensaios iniciais, onde não foram adicionados nutrientes externos ao meio MRS, obtivemos produtividade média de nisina em quantidades muito aquém daquelas obtidas quando da adição dos nutrientes, os valores máximos de produtividade não passaram de 0,061 mg nisina/ mg célula seca (tabela 6). Tal produtividade atingiu valores cerca de 100 vezes maiores (5,808 mg nisina/ mg célula seca) no ensaio 19. O valor de velocidade de crescimento celular para os ensaios demonstram claramente a correlação entre produção celular e formação do lantibiótico, também verificado nos ensaios preliminares (tabela 6). Isto é conhecido e previsto entre os pesquisadores que afirmam que a produção de nisina é diretamente ligada ao crescimento celular .

Todos os gráficos oriundos das equação principal obtida pela regressão multiparamétrica, citadas na análise dos resultados estão nas figuras de 12 a 19, relativos às equações 1 a 8.

Um indicador da correlação positiva entre produção de nisina e produção celular é verificado na figura 20.

A partir dos dados de velocidade específica de crescimento celular não pudemos correlacionar $\mu_{\max}$ com os rendimentos máximos de nisina obtidos. Isto se deve, provavelmente, a uma fração considerável do antibiótico ficar adsorvida à superfície da membrana celular em valores de pH próximos de 5,0 na fase log do processo de crescimento em processo descontínuo, com o abaixamento de pH (formação de ácido láctico).

No entanto para os ensaios iniciais, (tabela 15) observamos correlação positiva entre título de nisina e velocidade específica de crescimento celular (μX), é um dado interessante pois é obtido durante a fase de adaptação celular, antes do isolamento do microrganismo para o preparo de inóculo nas fases posteriores do trabalho.

Verificamos ainda que, nos meios com adição de nutrientes, em que quando a proporção P/C ficou entre 0,83 e 1,44 (figura 21), obtivemos altos valores de nisina produzida. Isto pode ser devido à ação tamponante do fosfato de potássio. Acreditamos que, ao realizarmos ensaios de produção da bacteriocina em sistema com controle de pH (em fermentadores e em escala maior), possivelmente a proporção P/C possa ser alterada para menos.

Figura 20 – Correlação positiva entre concentração celular (mg/L) e LOG POT ($\text{Log}_{10}\text{AU/mL}$) do lantibiótico nisina produzida em processo descontínuo.

O Tween 80 está ligado ao fenômeno de dispersão da nisina da membrana para o meio de cultivo, em função do caráter anfipático da molécula de nisina. Apesar de adicionado em pequenas quantidades no meio de cultivo, concluímos que seu efeito não pôde ser negligenciado.

A carência de asparagina diminui o rendimento de produção. Sua adição foi proposta como constituinte de meio de cultivo, reguladora e como fonte de nitrogênio para o crescimento celular. Asparagina agiria também como ativadora de sítio de conversão de nisina A para nisina Z, que apresenta características de solubilidade mais interessantes para a utilização industrial.

Tabela 20 – Resultados de produtividade, produção, produção específica e potência da nisina em ensaios iniciais com taxas de velocidade celular (μX) crescentes.

Ensaio	LOG P	Pmedia	AU/mgC	μX	mg Nis/L	mgNis/ mgCélulas	Potência (AU/mL)
1	2,015	2,878	0,191	0,0183	25,90	0,048	104
2	2,099	3,487	0,213	0,0157	31,38	0,053	126
3	1,807	1,781	0,103	0,0331	16,03	0,026	64,1
4	2,057	3,168	0,174	0,0305	28,51	0,043	114
5	1,682	1,336	0,089	0,0387	12,02	0,022	48,1
6	2,224	4,650	0,243	0,0487	41,85	0,061	167

Figura 21 – Avaliação da influência da proporção P/C e do pH final de processo na produção de nisina expressa como Log POT.

Figura 22 – Influência de nutrientes sacarose e fosfato adicionados ao caldo MRS para produção de nisina (dados dos ensaios do grupo 01).

Segundo Qiao et al. (1991) a nisina apresenta mecanismo regulando sua própria síntese. Assim o acúmulo de nisina no meio externo é fator determinante de sua expressão através de mecanismo de auto-imunidade. Isto abre perspectivas interessantes de estudo da fermentação para obtenção do antibiótico por processo contínuo ou utilização de processo em duas fases (“two phase fermentation system”) em dois solventes imiscíveis com coeficiente de partição hidrofóbicos diferentes, onde tenta-se evitar acúmulo do produto durante o processo. Assim, a nisina produzida em função do pH de processo, migraria para o solvente apropriado de maneira a evitar o seu acúmulo e seu efeito inibidor.

O processo de adição de nutrientes (em processo contínuo ou descontínuo alimentado), somado à otimização de processo em termos de nutrientes balanceados, poderia fornecer elevadas produtividades em nisina.

5.10 – Resumindo os dados da regressão, fatores e proporções.

Após esta breve discussão, alguns dados verificados a partir das equações e dos dados experimentais, poderiam ser apresentados de maneira mais sintética na forma de itens, de maneira a tentar obter a relação em massa entre os nutrientes aplicadas para otimização do meio de cultivo: (dados das tabelas de 11 a 18 e respectivas equações) :

Itens:

Constatação 1

Em todos os casos, quando o fator $SAC = -1$ temos que a potencia de nisina é baixa ($LOG P < 2$)

Constatação 2

Em todos os casos em que o fator $FOS = +1$ e $SAC = +1$ temos que a potencia é alta ($LOG P > 4$)

Relação entre os nutrientes nestes casos: Relação $C/P = 12,5/18 = 0,69 *$

Constatação 3

Em todos os casos que o fator $ASN = +1$ e o fator $SAC = +1$ temos que a potencia é alta ($LOG P > 4$)

Exceto quanto a condição 2 não foi satisfeita (Equação 6) pois neste caso o fator $FOS = -1$.

Relação entre os nutrientes nestes casos: Relação $C/N = 12,5 / 75 = 0,17^*$

Constatação 4

Em todos os casos em que o fator $ASN = +1$ e $FOS = +1 \rightarrow$ Potencia ($LOG P > 4$)

Exceto quando a condição 2 não foi satisfeita (Equação 3) pois neste caso o fator $SAC = -1$.

Relação entre os nutrientes nestes casos: Relação $N/P = 75/18 = 4,17^*$

De posse das relações acima destacadas, podemos comparar os resultados obtidos com as proporções de nutrientes propostas no meio MRS modificado.

A seguir mostra-se os dados sintetizados na forma da tabela 21, onde se verifica a correlação entre os principais fatores, proporções e pontos de máximo de produção de nisina.

					mg Nis/L	mgNis/ mg X	Pmedia AU/mLh	AU/mgC	Ys/p(%)	uX h ⁻¹	LOGPOT
Ensaio	C/N	N/P	C/P	P/C							
1	1,33	0,50	0,67	1,50	31,38	0,056	3,49	0,23	112,33	0,40	2,099
2	3,33	0,50	1,67	0,60	74,42	0,126	8,27	0,51	43,13	0,04	2,474
3	0,13	5,00	0,67	1,50	41,85	0,078	4,65	0,31	73,81	0,03	2,224
4	0,33	5,00	1,67	0,60	1.202,33	1,757	133,59	7,03	37,10	0,05	3,682
5	1,33	0,25	0,33	3,00	0,99	0,002	0,11	0,01	78,50	0,04	0,599
6	3,33	0,25	0,83	1,20	313,83	0,730	34,87	2,92	52,56	0,05	3,099
7	0,13	2,50	0,33	3,00	4,61	0,009	0,51	0,04	32,52	0,04	1,265
8	0,33	2,50	0,83	1,20	1.942,48	3,130	215,83	12,52	33,84	0,02	3,890
9*	0,17	4,17	0,69	1,44	4.184,95	6,459	464,99	25,83	21,23	0,02	4,224
10	0,17	12,50	2,08	0,48	9,92	0,016	1,10	0,06	11,87	0,02	1,599
11*	0,17	4,17	0,69	1,44	3.802,10	5,669	422,46	22,68	22,89	0,02	4,182
12	0,67	1,25	0,83	1,20	558,07	0,779	46,51	3,12	40,40	0,02	3,890
13	1,67	1,25	2,08	0,48	313,83	0,400	26,15	1,60	11,44	0,02	2,890
14	0,07	12,50	0,83	1,20	235,34	0,337	19,61	1,35	37,53	0,02	2,849
15	0,17	12,50	2,08	0,48	74,42	0,103	6,20	0,41	9,55	0,02	2,599
16	0,67	0,42	0,28	3,60	558,07	0,800	46,51	3,20	25,11	0,02	3,682
17	1,67	0,42	0,69	1,44	120,23	0,172	10,02	0,69	5,93	0,02	3,932
18	0,07	4,17	0,28	3,60	16,03	0,026	1,34	0,10	36,99	0,02	2,932
19*	0,17	4,17	0,69	1,44	3.802,10	5,868	316,84	23,47	14,83	0,02	4,265
20	0,21	3,44	0,73	1,37	819,14	1,402	68,26	5,61	24,50	0,01	3,599
21	0,21	3,44	0,73	1,37	819,14	1,402	68,26	5,61	24,45	0,02	3,640
22	0,21	3,44	0,73	1,37	507,02	0,888	42,25	3,55	24,41	0,01	3,224
23	0,21	3,44	0,73	1,37	507,02	0,794	42,25	3,17	23,11	0,02	3,307
24	0,21	3,44	0,73	1,37	313,83	0,471	26,15	1,88	19,58	0,02	3,307
25	0,05	3,44	0,18	5,45	558,07	0,886	46,51	3,54	127,69	0,02	3,474
26	0,36	3,44	1,25	0,80	819,14	1,264	68,26	5,06	18,30	0,02	3,724
27	1,17	0,63	0,73	1,37	313,83	0,498	26,15	1,99	39,03	0,01	3,307
28	0,09	8,17	0,73	1,37	2.138,08	3,277	178,17	13,11	44,44	0,02	3,932
29	0,21	6,88	1,46	0,69	120,23	0,183	10,02	0,73	37,32	0,01	2,682
30	0,21	1,88	0,40	2,51	194,25	0,311	16,19	1,24	41,20	0,01	2,890

Tabela 21 - Relações de nutrientes destacadas na tabela que, para o conjunto de proporções deduzidos dos dados da regressão e os dados experimentais, são relacionados aos pontos de máxima produtividade de nisina.

CONCLUSÕES

- ❖ Foi demonstrado que existem proporções entre os nutrientes, as quais contribuíram favoravelmente a alcançar os melhores títulos de nisina.
- ❖ Nestas condições, a mais alta produtividade específica ficou em 22 AU/ mg de células correspondendo a uma média de 6,0 mg nisina por mg de célula seca, demonstrados, em média, nos ensaios 09, 11 e 19.
- ❖ As proporções de nutrientes no intervalo de valores ótimos adotados ficaram em: $0,17 < C/N < 1,7$ e $0,42 < N/P < 4,16$, mantendo uma faixa de $0,69 < C/P < 0,83$. O título de nisina variou de 2,6 to 4,1 $\text{Log}_{10}\text{AU/mL}$.
- ❖ Produção de nisina mostrou-se independente das velocidades de crescimento, as quais variaram de 0,0070 h⁻¹ a 0,0401 h⁻¹. Porém mostrou-se correlação positiva com o total de biomassa celular produzida.
- ❖ A análise de regressão mostrou se adequar a um modelo polinomial quadrático: $\text{Log AU/mL} = 1,98905 - 0,213558 \text{ ASN} + 1,80028 \text{ FOS} - 1,40776 \text{ TWN} + 0,23436 \text{ SAC*ASN} + 0,35936 \text{ SAC*FOS} + 1,47217 \text{ FOS*TWN}$. A análise de variância foi realizada para os parâmetros fixados para demonstrar a adequação do modelo proposto.
- ❖ Tais resultados mostraram a importância da adição de nutrientes no meio nas proporções ideais as quais levaram a máxima produtividade em nisina em processo tipo batch, com pH não controlado nas condições experimentais utilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS*

*Segundo as normas preconizadas pela ABNT NBR6023/89 (Associação Brasileira de Normas Técnicas). As abreviaturas seguem o padrão do Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI, 1990)

ABEE, T., KROCKEL, LOTHAR, HILL, C. Bacteriocins: Modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.**, Cincinnati, v.28, p.169-185, 1995.

AMIALI, M.N., LACROIX, C., SIMARD, R.E. High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. **World J. Microbiol. and Biotechnol.**, Hagerstown, v.14, p.887-894, 1998.

ANONYMOUS - BRASIL, DINAL approves microbiological standards for foodstuffs. In: Laws and Decretes. **Diário Oficial de União**. Brasília, section 1, p.2197-2200, 1987.

BENKERROUM, N. E SANDINE, W.E. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.71, p.3237-3245, 1988.

BLACKBURN, P.; GUSIK, S.A. , POLAK, J. E RUBINO, S. D. Novel bacteriocin compositions for use as enhanced broad range bactericides and methods of prevention and treating microbial infection. **US. Patent.**, Washington, v.4, p.980-163, 1990.

BLOM, H., KATLA, TONE, HAGEN, B., AXELSON, L. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. **Int. J. Food Microbiol.**, Cincinnati, v.38, p.103-109, 1997.

BUCHMAN, G.W.; BANERJEE, S. E HANSEN, J.N. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.263, p.16260-16266, 1988.

CARMEN, M., PELAEZ, C., JUAREZ, M., REQUENA, T. Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* and *Lactobacillus casei*. Cell lysis induced by a crude bacteriocin. **Int. J. Food Microbiol.**, Cincinnati, v.38, p.125-131, 1997.

CHINACHOTI, N.; HIROMI MATSUSAKI; KENJI SONOMOTO; AYAANKI ISHIZAKI - Nisin Z Production by *Lactococcus lactis* IO-1 Using Xylose as a Carbon Source **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v.62, n.5 p.1022-1024, 1998.

DAVIES, E.A., BEVIS, H.E., DELVES-BROUGHTON, J. The use of the bacteriocin nisin as preservative in ricotta type cheeses to control food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Letters applied microbiol.**, v.24, p.343-46, 1997.

DAVIES, E.A., POTTER, B., HARRIS, J. DELVES-BROUGHTON, J. The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. **Let. Appl. microbiol.**, London, v.27, p.186-87, 1998.

DE VOS, W.M., BEERTHUYZEN, M.M., LUESINK, E.L. E KUIPERS, O. P. Genetics of the nisin operon and the sucrose-nisin conjugative transposon Tn5276. **Dev. Biol. Stand.**, Basel, v.85, p.617-625, 1995.

DE VOS, W.M., MULDER, J. W., SIEZEN, R.J., HUGENHOLTZ, J. E KUIPERS, O. P. Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*., **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, p.213-218, 1993.

DE VUYST, L., VANDAMME, E.J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. **J. Gen. Microbiol.**, London, v.138, p. 571-578, 1992.

DE VUYST, L., VANDAMME, E.J. Lactic acid bacteria and bacteriocins: Their practical importance. In: **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. eds. De Vuyst, L. e Vandamme, E.J pp. 1-12. Chapman & Hall, Glasgow, 1994.

DE VUYST, L., VANDAMME, E.J. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production In: *Lactococcus lactis* subsp *lactis* batch fermentations using a complex medium v.40, p.17-22, 1993.

DELVES-BROUGHTON J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R.J. AND HUGENHOLTZ J. Applications of the bacteriocin nisin [Review] **Antonie Leewenhoek**, v.69, p.193-202, 1990.

DEVUYST, L., J. VANDAMME.. Nisin, an antibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications, Glasgow, p.151-221, 1994.

DODD, H. M., N. HORN, M. J. GASSON.. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. **J. Gen. Microbiol.** London, v.136, p.555-566, 1990.

DODD, H. M., N. HORN, C. J. GIFFARD, AND M. J. GASSON. A gene replacement strategy for engineering nisin. **J. Microbiol.** Washington, v.142, p.47-55, 1996.

ELLI, M., ZINK, RALF, RENIERO, R., MORELLI, L. Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk. **Int. Dairy J.**, Savoy, v.9, p.507-513, 1999.

FOWLER, G.G. E GASSON, M.J. Antibiotics-Nisin. In Russel , N.J. e Gould, G.W. (eds.) **Food Preservatives**. Blackie, London, UK. p.135-153, 1991.

GOULD, G. W. E HURST, A., Inhibition of *Bacillus* spore development. [Abstract] **Proc. 8th Int. Conf. Microbiol.** A2-A11.

GOWANS, J.L., SMITH, N., FLOREY, H.W. Some properties of nisin. **Brit J Pharmacol and Chemother**, London, v.7 , p.438-49, 1952.

GRAEFFE, T.; RINTALA, H.; PAULIN, L. E SARIS, P.E.J. a natural nisin variant. In Jung, G. e Sahl, H-G. (eds.) Nisin and novel lantibiotics. **ESCOM Science Publishers**, Leiden. p.260-268, 1991.

GROSS, E. AND MORELL, J.L. The structure of nisin **J. Am. Chem. Soc.**, New York, v.93, p.4634-4635, 1971.

HANCOCK, R.E. Peptide antibiotics [Review]. **Annu Ver Microbiol. Lancet**, London, v.349, p.418-22, 1997.

HANSEN, J.N. Antibiotics synthesized by posttranslational modification. [Review]. **Annu. Rev. Microbiol.** Palo Alto, v.47, p. 535-564, 1993.

HANSEN, J.N., CHUNG, Y. , LIU, W. Biosynthesis and mechanism of action of nisin and subtilin. In: Nisin and novel lantibiotics. **ESCOM Science Publishers**, Leiden. p.287-302, 1991.

HIRSCH, A; AND GRINSTED, E.; CHAPMAN, H.R. AND MATTICK, A A note on the inhibition of na anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by nisin-producing *Streptococcus*. **J. dairy Res.**,v.18, p.205-206, 1951.

HOFVENDAHL, K., HAGERDAL-H. B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technol.** v.26, p.87-107, 2000.

HURST, A. , KRUSE, H. Effect of secondary metabolites on the organisms producing them: effect of nisin on *Streptococcus lactis* and enterotoxin B on *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.1, p.277-79, 1972.

IMMONEN, T., YE, S., RA, R., QIAO, M., PAULIN, L. & SARIS P. E. J. The codon usage of the nisZ operon in *Lactococcus lactis* N8 suggests a non-lactococcal origin of the conjugative nisin- sucrose transposon. **DNA Sequence**, Bethesda, v.5, p.203-218, 1995.

JACK, R. W.; TAGG, J. R. E RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. [Review]. **Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.59, p.171-200, 1995.

JUNG, G. Lantibiotics-ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α and β -didehydroamino acids. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, Erlangen, v.30, p.1051-1192, 1991.

JUNG. G. Lantibiotics: a survey. In: Nisin and novel lantibiotics. Eds. Jung, G. and Sahl, H.G.. p. 1034 **ESCOM**, Leiden, Netherlands, 1991.

JAQUETTE, C.B., BEUCHAT, L.R. Combined effects of pH, nisin and temperature on growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. **J. food protection**, Des Moines, v.61, n.5, p.563-570, 1998.

KIM WS, HALL RJ, DUNN NW; The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Heidelberg, v.48, n.4, p.449-53, 1997.

KIM, W.S. Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture. **Letters Applied Microbiol.**, Mansfield, v.25, n.3, p.169-71, 1997.

KLAENHAMMER, T.R., AHN, C., FREMAUX, C., MILTON, K. Properties of *Lactobacillus bacteriocins*. In: Bacteriocins, microcins and lantibiotics. Eds. James,R., Ladzunski, C. e Pattus, F. Series NATA ASI 65, Springer-Verlag, Berlin, 1992.

KLEEREBEZEM,M.; HOLS, P.; HUGENHOLTZ, J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. **Enzyme Microbial Technol.**, New York, v.26, p.840-848, 2000.

KORDEL, M. E SAHL, H-G Susceptibility of bacterial, eucaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep 5 and nisin. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.34, p.139-144, 1986.

KOZAK, W., DROBZANSKI, W.T. Growth requirements and the effect of organic components of the synthetic medium on the biosynthesis of the antibiotic nisin in *Streptococcus lactis* strain. **Acta Microbiol.**, London, v.26, p.361-68, 1977.

KOZAK, W.; BARDOWSKI, J. e Dobrzanski, W.T. Lactostrepcins acid bacteriocins produced by lactic *streptococci*. **J. Dairy Res.**, v.45, p.247-257, 1978.

KUIPERS, O. P.; BEERTHUYZEN , M.M; SIEZEN, R.J. E DE VOS, W. M. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. **Eur. J. Biochem.**, v.216, p.281-291, 1993.

KUPKE, T. E GÖTZ, F. Post-translational modifications of lantibiotics. [Review]. **Antonie Leeuwenhoek**, v.69, p.139-150, 1996.

LI, CHAN, OUYANG,F., BAJ, JINGHUA - Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using a polyethylene glycol/MgSO₄ aqueous two-phase system to produce nisin. **Biotechnol. Letters**, Dordrecht, v.22, p.843-47, 2000.

LIU, W., HANSEN, J.N. The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanism . **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, p.648-651, 1993.

LIU, W. E HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. . **Appl. Environ. Microbiol.**, Reston, v.56, p.2551-2558, 1990.

LOPRETTI, M., MARTINEZ, E., TORRES, L. RODRIGUES, A.E. Influence of nitrogen/ carbon ratio and complementary sugars on dextranase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL 512. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v.34, p.879-884, 1999.

LUC DE VUYST - Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. **J. Applied Bacteriol.**, v.78, p.28-33, 1995.

MATSUSAKI H, ENDO N, SONOMOTO K, ISHIZAKI, A. - Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.3, n.45, p.36-40, 1996.

MATTICK, A. T. R. E HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic *streptococci*. **Lancet**, London, v.2, p.5-7, 1947.

MEANWELL, L.J. The influence of raw milk quality on "slowness" in cheesemaking. **Proc. Soc. Agr. Bacteriol.**, v.19, 1943.

MEGHROUS J, HUOT E, Quittelier M, Petitdemange H. Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis*. **Res. Microbiol.**, v.143, n.9, p.879-90, 1992.

MONTVILLE, T.J., ROGERS, A.M. Improved diffusion assay for nisin quantification. **Food Biotechnol.**, Berlin, v.5, p.161-68, 1991.

MONTVILLE, T.J., WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: Doyle, MP., Beuchat, L.R., Montville, T.J. Ed Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington: ASM Press, p. 557-558, 1997.

MORRIS, S.L.; WALSH, R.C. E HANSEN, J.N. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. **J. Biol. Chem.** Stanford, v.259, p.13590-13594, 1984.

MULDERS J.W., BOERRIGTER, I.J.; ROLLEMA, H.S.; SIEZEN, R.J. AND DE VOS W.M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **Eur. J. Biochem.**, v.201, p.581-584, 1991.

MURIANA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria spp.* In food **J. Food Prot.**, Ames, suppl., Washington, p.54-63, 1996.

MURIANA, P.M., KLAENHAMMER, T.R. Purification and Partial Characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. **Applied Environm. Microbiol.**, v.57, p.114-21, 1991.

NANDAKUMAR, R., MATTIASSON, B. Quantification of nisin in flow injection immunoassay systems. **Biosensors Bioeletronics**, v.15, p.241-47, 1999.

NES, I. F. E TAGG, J.R. Novel lantibiotics and their pre-peptides. [Review]. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 69, p.89-97, 1996.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B., EIJSINK, V. E HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. [Review]. **Antonie Leeuwenhoek**, v.70, p.113-128, 1996.

NISSEN-MEYER, J. AND NES, I.F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, struture, biogenesis, and mechanism of action. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v.167, p.67-77, 1997.

NOPPAWAN CHINACHOTI; HIROMI MATSUSAKI; KENJI SONOMOTO; AYAANKI ISHIZAKI, PADGETT, T. HAN, I.Y., DAWSON, P.L. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. **J. Food Protection**, v.61, n.10, p.1330-1335, 1998.

PALMIERI, A., PEPE, I.M., ROLANDI, R. Channel formation activity of the lantibiotic nisin on bilayer lipid membranes. **Thin Solid Films**, Berlin, v.284, p.822-24, 1996.

PARWIN, B.VIAL, WLODZIMIERS GRAJEK, XAVIER DOUSSET - Continuous bacteriocin production with high cell density bioreactors **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.21, p.450-57, 1997.

PASCALLE, G.G., DE RUYTER, O., BEERTHUYZEN, I., DE VOS, WILLEN. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.6- p.3434-3439, 1996.

QIAO M, YE S, KOPONEN O, RA R, USABIAGA M, IMMONEN T, SARIS PE Regulation of the nisin operons in *Lactococcus lactis* N8. **J. Appl. Bacteriol.**, Adelaide, v.80, n.6, p.626-34, 1996.

QIAO, M. AND SARIS, P.E.J. Evidence for a role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8. **FEMS Microbiol. Lett.**, Berlin, v.144, p.89-93, 1996.

QIAO, M., OMAETXEARRIA, M. J., RA, R., ORUETXEARRIA, I. AND SARIS, P. E. J. Isolation of a *Lactococcus lactis* strain with high resistance to nisin and increased nisin production. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v.19, p.199-202, 1997.

QIAO, M.; IMMONEN, T.; KOPONEN, O. E SARIS, P.E.J. The cellular location and effect on nisin immunity of the NisI protein from *Lactococcus lactis* N8 expressed in *Escherichia coli* and *L. lactis*. **FEMS Microbiol.**, Berlin, v.133, p.75-80, 1995.

QIAO, M.; YE S. KOPONEN, O. RA R, USABIAGA, M., IMMONEN, T. AND SARIS, P.E.J. Regulation of the nisin operons in *Lactococcus lactis* N8 **J. Appl. Bacteriol.**, Adelaide, v.80, p.626-634, 1996.

RA, R., QIAO, M., IMMONEN, T., PUJANA, I. & SARIS, P. E. J. Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. **Microbiol.** v.142, p.1281-88, 1996.

RAYMAN, K. E HURST, A. Nisin: properties, biosynthesis and fermentation. In **Biotechnology. Industrial Antibiotics**, ed. E. J. Vandamme. Marcel Dekker Inc., New York, p.607-628, 1984.

RAYMAN, M.K., MALIK, N., HURST, A. Failure of nisin to inhibit the outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. **Applied Environ. Microbiol.**, v.46, p.1450-2, 1984.

RODRIGUEZ, J.M.; HELEN M.D. Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. **Microbiologia SEM**, Madrid, v.12, p.61-74, 1996.

ROGERS, L.A. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.16, p.321-5, 1928.

RUHR, E. E SAHL, H-G Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potêncial of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.27, p.841-5, 1985.

SAHL, H.G. Pore formation in bacterial membranesby cationic lantibiotics. . In Nisin and Novel lantibiotics Eds. JUNG, G. E SAHL, H.G. p. 1034 **ESCOM**, Leiden, Netherlands, 1991.

SAHL, H-G; JACK, R.W. AND BIERBAUM, G. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.230, p.827-53, 1995.

SALYERS, A.A.; SHOEMAKER, N.B.; STEVENS, A.M. e Li, L.Y. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. [Review]. **Microbiol. Rev.**, v.59, p.579-90, 1995.

SCANELL, G.M.A., HILL, G., ROSS, R.P., HARTMEIER, W. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lacticin 3147 and Nisaplin. **Int. J. Food Microbiol.**, Cincinnati, v.60, p.241-9, 2000.

SCHNELL, N. ENTIAN, K-D.; SCHNEIDER, U.; GÖTZ, F. ; KELLER, R. E JUNG, G. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulfide-rings. **Nature**, London, v.333, p.178-276, 1988.

SEARS, P.M., SMITH, B.S. STEWART, W.K. Evaluation of a nisin based germicidal formulation on teat skin of live cows. **J Dairy Sci.**, v.75 p.3185-90, 1992.

SEVERINA, E.; SEVERIN, A. E TOMAZ, A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **J. Antimicrob. Chemother.**, New York, v.41, p.341-7, 1988.

SHIMIZU, H., MIZUGUCHI, T., TANAKA, E. Nisin production by a mixed-culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus* **Appl. Environm. Microbiol.**, v.7, p.3134-41, 1999.

SOMMERS, E.B. E TAYLOR, S.L. Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized processed cheese spreads. **J. Food Protection.**, New York, v.50, p.842-8, 1987.

SOMOGYI-NELSON Notes on Sugar Determination **J. Biol. Chem.** Baltimore, p.19-23, 1952.

SONOMOTO K., CHINACHOTI, N., ENDO N, , ISHIZAKI A Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. **J. Molecular Catalysis B. Enzymatic.**, Berlin, v.10, p.325-34, 2000.

STEVENS, K.A.; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A. KLAENHAMMER, T.R. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of gram-negative bacteria. **J. Food Protection**, Des Moines, v.55, p.763-776, 1991.

STEVENS, K.A; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A. KLAENHAMMER, T.R. Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, New York, v.57, p.3613-5, 1991.

STOCK, J.B.; NINFA, A.J. E STOCK, A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. [Review]. **Microbiol. Rev.**, New York, v. 53, p.450-90, 1989.

THOMPSON, J.; HARR, R.J. E DONKERSLOOT, J.A. N5-(L-1-Carboxyethyl)-L-ornithine: NADP⁺ oxidoreductase in *Streptococcus lactis*: Distribution, constitutivity, and regulation. **Curr. Microbiol.**, Berlin, v.20, p.239-44, 1990.

THOMPSON, J.; NGUYEN, N.Y., SACKETT D.L. AND DONKERSLOOT J.A. Transposon encoded sucrose metabolism in *Lactococcus lactis*. Purification of sucrose-6-phosphate hydrolase and genetic linkage to N5-(L-1-carboxyethyl)-L-ornithine synthase in strain K1 **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.266, p.626-22633, 1990.

VAN DE VEN, F.J.M., VAND DEN HOOVEN, H.W. , KONINGS, R.N.H. NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution. In Nisin and Novel lantibiotics Eds. Jung, G. and Sahl, H.G.. p. 1034 **ESCOM**, Leiden, Netherlands, 1991.

VERHEUL, A.; RUSSELL, N.J.; VAN'T HOF, R.; ROMBOUTS, F.M E ABEE, T. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. **Appl. Environ. Microbiol.**, New York, v.63, p.3451-57, 1997.

VIGNOLO, G.M., KAIRUZ, M.N., HOLGADO, A.A.P.R., OLIVER, G. Influence of growth conditions ont the produ tion of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei*, CRL 705. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.78, p.5-10, 1995.

WAHLSTROM, G., SARIS, P. A nisin bioassay based on bioluminescence. **Applied and Environ. Microbiol.**, New York, v.8, 1999.

WHITEHEAD, H. R. E RIDDET, W. Slow development of acidity in cheese manufacture. **New Zealand J. Agric.**, Wellington, v.46, p.225-9, 1933.

ANEXO 01

DEFINIÇÕES UTILIZADAS:

Cada quantidade discreta de 2,5 mg nisina equivale a 10^5 UI de Nisina oriunda de preparação comercial Nisaplin^R (Aplin e Barret, Eng.)

Relações de massa = Proporção massa/massa do nutrientes adicionados ao meio: Sacarose (C); Asparagina (N); Fosfato de potássio (P) e Tween 80 (T)

As velocidades instantâneas foram calculadas a partir da curva de regressão linear (método dos mínimos quadrados) de $\ln X$ por T, determinando-se a inclinação correspondente.

*Os valores de produtividade, produtividade específica e relações que descrevem o processo são estimados a partir dos dados experimentais coletados, estando sujeitos aos respectivos erros correspondentes, inerentes à cada método aplicado.

ANEXO 01 – DADOS EXPERIMENTAIS E GRÁFICOS DE PROCESSO:

ENSAIOS INICIAIS

ENSAIOS DO GRUPO 01

ENSAIOS DO GRUPO 02

ENSAIOS DO GRUPO 03

ENSAIOS INICIAIS

Sem adição de nutrientes
E1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,55	0,65	1,18
14	6,3	0,93	1,3
18	6,21	1,12	1,28
22	6,18	1,28	1,38
36	6,2	1,21	1,49

E2

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,5	0,5	1,19
12	6,35	0,92	1,28
24	6,2	1,21	1,47
36	6,15	1,62	1,5
48	6	1,7	1,41
72	6,05	1,65	1,41

E3

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,25	0,4	1,17
12	6,2	0,45	1,21
18	6	0,9	1,29
24	5,85	1,23	1,44
36	5,65	1,45	1,45
48	5,5	1,69	1,38

E4

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,05	0,36	1,11
12	5,8	0,43	1,2
16	5,77	0,78	1,31
22	5,61	1,22	1,41
38	5,33	1,39	1,5
48	5,5	1,4	1,32

E5

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,5	0,12	0,81
13	6	0,21	0,94
19	5,55	0,35	1,12
23	5,33	0,44	1,54
38	5,12	0,48	1,71

E6

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,5	0,09	0,74
6	6	0,18	1,1
16	5,7	0,28	1,35
24	5,5	0,35	1,46
30	5,33	0,49	1,5
40	5,1	0,53	1,54

INFLUENCIA DA SACAROSE

E1

Tempo (h)	pH	abs	diam halo	ART
0	6,55	0,29	0,74	5,5
6	6,4	0,33	0,85	5,43
12	6,12	0,41	1,1	4,8
16	5,81	0,54	1,29	4,41
24	5,5	0,79	1,3	3,92
32	5,25	1,1	1,32	3,54
36	5,15	1,21	1,33	3,12

ART ini 5,5 g/L
ART res 3,12 g/L

E2 ART ini 5,34 g/L

Tempo (h)	pH	abs	diam halo	ART
0	6,75	0,3	0,75	5,34
4	6,5	0,34	0,91	5,29
12	6,24	0,46	1,15	4,64
16	5,9	0,59	1,36	4,4
24	5,55	0,82	1,44	4,1
32	5,32	1,21	1,46	3,82
36	5,22	1,31	1,45	3,61

ART ini 5,34 g/L
ART res 3,61 g/L

E3

Tempo (h)	pH	abs	diam halo	ART
0	6,6	0,31	0,84	5,19
4	6,49	0,37	0,99	5,06
12	6,2	0,51	1,23	4,71
16	5,84	0,6	1,39	4,35
24	5,62	0,87	1,51	3,9
32	5,4	1,23	1,59	3,55
37	5,15	1,39	1,62	3,61

E4

Tempo (h)	pH	abs	diam halo	ART
0	6,75	0,39	0,91	5,49
4	6,39	0,45	1,05	5,32
12	6,15	0,64	1,29	4,64
17	5,75	0,85	1,44	4,31
24	5,3	1,16	1,62	3,64
32	5,12	1,24	1,69	3,33
36	4,91	1,46	1,75	3,21

ART ini 5,49g/L

ART res 3,21g/L

E5

Tempo (h)	pH	abs	diam halo	ART
0	6,55	0,33	0,73	5,05
4	6,31	0,41	0,92	5,29
12	6,12	0,65	1,09	4,51
16	5,91	0,89	1,12	4,22
24	5,33	0,96	1,33	3,54
32	5,15	1,21	1,47	3,12
36	5,12	1,2	1,5	3,15
42	5,1	1,23	1,51	3,21

ART ini 5,05g/L

ART res 3,21g/L

E6

Tempo (h)	pH	abs	diam halo	ART
0	6,51	0,79	0,25	5,26
4	6,33	1,02	0,35	5,1
12	6,12	1,19	0,44	4,8
16	5,71	1,41	0,59	4,26
24	5,5	1,47	0,67	3,95
32	5,22	1,55	1,12	4,12
36	5,1	1,53	1,23	3,55
44	5,15	1,55	1,24	3,51

ART ini 5,05g/L

ART res 3,21g/L

INFLUENCIA DA FONTE DE NITROGENIO

ASPARAGINA

E1

MRS + ASN 0,1 N (0,02 MOLES)

Tempo (h)	pH	abs	diam halo
0	6,72	0,3	0,74
4	6,5	0,34	0,86
12	6,39	0,49	1,12
16	6,24	0,59	1,33
24	6,12	0,9	1,45
28	5,91	1,21	1,47
35	5,82	1,29	1,51
40	5,8	1,3	1,5

ART ini 5,12g/L

ART fin 3,19g/L

E2

MRS + ASN 0,1 N (0,04 MOLES)

Tempo (h)	pH	abs	diam halo
0	6,8	0,41	0,8
4	6,49	0,49	0,96
12	6,23	0,65	1,22
16	6	0,74	1,44
24	5,84	1,12	1,47
28	5,69	1,34	1,51
35	5,51	1,33	1,6
40	5,5	1,3	1,64

ART ini 5,13g/L

ART fin 3,02g/L

E3

MRS + ASN 0,1 N (0,1 MOLES)

Tempo (h)	pH	abs	diam halo
0	6,61	0,29	0,69
4	6,35	0,43	1,01
12	6,1	0,71	1,1
16	5,84	0,9	1,25
25	5,21	1,02	1,39
32	5,15	1,23	1,45
36	5,12	1,3	1,54
40	5,1	1,31	1,64

ENSAIOS DO GRUPO 01

E1			
FATORES	SAC	-1	
	ASN	-1	
	FOS	-1	
	TWN	-1	
tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,7	0,32	0,7
12	6,35	0,46	1,12
24	6,02	0,96	1,45
36	5,65	1,24	1,51
ART res.	1,01	g/L	
ac. Lat	2,15	g/L

E2
FATORES

SAC	1
ASN	-1
FOS	-1
TWN	1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,95	0,35	0,65
12	6,1	0,51	1,25
24	5,84	1,12	1,62
36	5,61	1,31	1,6
ART res.	1,15	g/L	
ac. Lat	3,21	g/L

E3
FATORES

SAC	-1
ASN	1
FOS	-1
TWN	1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,7	0,35	0,65
12	6,25	0,49	1,1
24	6	0,8	1,4
36	5,8	1,2	1,54
ART res.	0,29	g/L	
ac. Lat	2,44	g/L

E4
FATORES

SAC	1
ASN	1
FOS	-1
TWN	-1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,7	0,36	0,69
12	6,05	0,59	1,17
24	5,65	1,31	1,6
36	5,4	1,52	1,89
ART res.	0,65	g/L	
ac. Lat	3,12	g/L

E5
FATORES

SAC	-1
ASN	-1
FOS	1
TWN	1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,71	0,29	0,6
12	6,19	0,4	0,79
24	5,91	0,69	0,99
36	5,8	1	1,15
ART res.	1,15	g/L	
ac. Lat	1,29	g/L

E6
FATORES

SAC	1
ASN	-1
FOS	1
TWN	-1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,95	0,35	0,55
12	6,54	0,51	0,8
24	6,12	1,12	1,45
36	5,9	0,96	1,75
ART res.	1,9	g/L	
ac. Lat	3,15	g/L

E7
FATORES

SAC	-1
ASN	1
FOS	1
TWN	-1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,95	0,3	0,65
12	6,21	0,49	0,69
24	5,71	0,74	0,95
36	5,5	1,12	1,31
ART res.	0,33	g/L	
ac. Lat	1,05	g/L

E8
FATORES

SAC	1
ASN	1
FOS	1
TWN	1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,9	0,71	0,6
12	6,44	1	0,94
24	6	1,12	1,42
36	5,71	1,38	1,94
ART res.	0,95	g/L	
ac. Lat	2,65	g/L

E9
FATORES

SAC	1
ASN	1
FOS	1
TWN	1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,85	0,79	0,72
12	6,5	1,12	1,12
24	6,05	1,22	1,62
36	5,8	1,44	2,2
ART res.	4,12	g/L	
ac. Lat	2,46	g/L

E10
FATORES

SAC	1
ASN	1
FOS	-1
TWN	-1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,9	0,7	0,61
12	6,55	0,99	0,9
24	6,12	1,14	1,32
36	6	1,39	1,39
ART res.	3,39	g/L	
ac. Lat	2,09	g/L

E11
FATORES

SAC	1
ASN	1
FOS	1
TWN	-1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,4	0,8	0,84
12	6,01	0,99	1,22
24	5,95	1,34	1,69
36	5,81	1,49	2,01
ART res.	4,12	g/L	
ac. Lat	3,19	g/L

E12
FATORES

SAC	-1
ASN	-1
FOS	-1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,8	0,65	0,7
16	6,55	1,12	0,84
28	6,12	1,35	1,12
40	5,74	1,65	1,81
48	5,7	1,59	1,94
ART res.	1,94	g/L	
ac. Lat	2,39	g/L

E13
FATORES

SAC	1
ASN	-1
FOS	-1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,8	0,69	0,7
16	6,41	1,24	0,89
28	6,05	1,41	1,23
40	5,46	1,69	1,75
48	5,5	1,74	1,7
ART res.	2,39	g/L	
ac. Lat	1,69	g/L

E14
FATORES

SAC	1
ASN	-1
FOS	-1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,8	0,68	0,65
16	6,61	1,12	0,95
28	5,95	1,31	1,33
40	5,59	1,49	1,72
48	5,6	1,55	1,69
ART res.	1,94	g/L	
ac. Lat	2,22	g/L

E15
FATORES

SAC 1
ASN 1
FOS 1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,55	0,55	0,65
16	6,31	0,92	0,91
28	6,12	1,16	1,25
40	6	1,45	1,6
48	5,85	1,51	1,63
ART res.	1,61	g/L	
ac. Lat	2,01	g/L

E16
FATORES

SAC -1
ASN -1
FOS 1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,29	0,57	0,55
16	6,01	1,02	1,02
28	5,84	1,24	1,24
40	5,7	1,51	1,81
48	5,72	1,55	1,89
ART res.	1,21	g/L	
ac. Lat	1,84	g/L

E17
FATORES

SAC	1
ASN	-1
FOS	1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,59	0,55	0,47
16	6,12	0,9	0,98
28	6,01	1,24	1,29
40	5,84	1,36	1,65
48	5,71	1,55	1,95
ART res.	2,12	g/L	
ac. Lat	1,19	g/L

E18
FATORES

SAC	-1
ASN	1
FOS	1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,51	0,55	0,41
16	6,3	0,86	0,91
28	6,04	2,21	1,31
40	6	1,3	1,44
48	5,91	1,36	1,71
ART res.	1,91	g/L	
ac. Lat	2,21	g/L

E19
FATORES

SAC	1
ASN	1
FOS	1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,39	0,61	0,65
16	6,1	0,89	1,51
28	5,86	1,12	1,86
40	5,55	1,37	2,01
48	5,31	1,44	2,11
ART res.	1,91	g/L	
ac. Lat	2,21	g/L

E20
FATORES

SAC 0
ASN 0
FOS 0

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,4	0,55	1,4
12	5,85	0,91	1,43
24	5,3	1,21	1,68
36	5,25	1,29	1,85
48	5,15	1,3	1,87
ART res.	3,24	g/L	
ac. Lat	1,91	g/L

E21
FATORES

SAC 0
ASN 0
FOS 0

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,51	0,55	1,4
12	5,8	0,95	1,48
24	5,2	1,21	1,75
36	5,15	1,24	1,85
48	5,17	1,3	1,88
ART res.	2,15	g/L	
ac. Lat	3,12	g/L

E22

FATORES

SAC

0

ASN

0

FOS

0

tempo (h)

pH

[cel]

ativ (cm)

0

6,6

0,59

1,4

12

5,75

0,96

1,47

24

5,15

1,26

1,73

36

5,05

1,31

1,8

48

5,1

1,27

1,78

ART res.

1,99

g/L

ac. Lat

3,19

g/L

E23
FATORES

SAC	0
ASN	0
FOS	0

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,61	0,64	0,69
12	6,4	1,12	1,31
24	5,9	1,31	1,75
36	5,6	1,4	1,8
48	5,55	1,42	1,8
ART res.	2,44	g/L	
ac. Lat	3,29	g/L

E24
FATORES

SAC 0
ASN 0
FOS 0

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,6	0,65	0,65
12	6,41	1,15	1,34
24	5,8	1,3	1,65
36	5,57	1,45	1,75
48	5,5	1,48	1,8
ART res.	2,12	g/L	
ac. Lat	3,15	g/L

E25
FATORES

SAC	-1
ASN	0
FOS	0

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,24	0,67	0,59
12	5,95	0,91	1,4
24	5,74	1,15	1,8
36	5,45	1,33	1,81
48	5,4	1,4	1,84
ART res.	2,65	g/L	
ac. Lat	3,95	g/L

E26
FATORES

SAC	1
ASN	0
FOS	0

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,31	0,71	0,6
12	5,9	0,95	1,45
24	5,75	1,21	1,83
36	5,6	1,39	1,85
48	5,5	1,44	1,9
ART res.	2,45	g/L	
ac. Lat	4,44	g/L

E27
FATORES

SAC	0
ASN	-1
FOS	0

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,51	0,65	0,7
12	5,75	1,05	1,46
24	5,25	1,3	1,7
36	5,1	1,34	1,75
48	5,05	1,4	1,8

ART res.	3,29g/L
ac. Lat	4,12g/L

E28
FATORES

SAC 0
ASN 1
FOS 0

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,6	0,65	0,71
12	5,8	1,12	1,49
24	5,65	1,39	1,75
36	5,25	1,4	1,9
48	5,2	1,45	1,95
ART res.	3,64	g/L	
ac. Lat	4,39	g/L

E29
FATORES

SAC 0
ASN 0
FOS -1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,45	0,8	0,69
12	5,75	1,15	1,31
24	5,15	1,31	1,7
36	5,01	1,39	1,69
48	4,05	1,46	1,65
ART res.	3,15	g/L	
ac. Lat	4,04	g/L

E30
FATORES

SAC	0
ASN	0
FOS	1

tempo (h)	pH	[cel]	ativ (cm)
0	6,4	0,81	0,65
12	5,8	1,21	1,32
24	5,4	1,26	1,71
36	5,05	1,38	1,7
48	5,15	1,39	1,7
ART res.	3,49	g/L	
ac. Lat	4,19	g/L