

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica  
Área de Tecnologia de Fermentações

Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis*  
subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator

Luciana Juncioni de Arauz

Tese para a obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientadora:  
Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo  
2011

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica  
Área de Tecnologia de Fermentações

Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis*  
subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator

Luciana Juncioni de Arauz

Tese para a obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientadora:  
Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo  
2011

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

Arauz, Luciana Juncioni de  
A663p Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator / Luciana Juncioni de Arauz. -- São Paulo, 2011.  
148p.

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

Orientador: Vessoni Penna, Thereza Christina

1. Lactococos : Microbiologia de alimentos 2. Proteína : Biotecnologia I. T. II. Vessoni Penna, Thereza Christina, orientador.

664.07 CDD

Luciana Juncioni de Arauz

Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis*  
subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna  
orientadora/presidente

Profa. Dra. Júlia Baruque Ramos  
1º. examinador

Dr. Wagner Quintilio  
2º. examinador

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad  
3º. examinador

Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho  
4º. examinador

São Paulo, 17 de março de 2011.

*Aos meus pais, Inez e Aramis, pelo incentivo,  
apoio e compreensão, em todos os momentos  
desta e de outras caminhadas.*

## *AGRADECIMENTOS*

*A Profa. Titular Dra. Thereza Christina Vessoni Penna, pela dedicada orientação, confiança e permanente incentivo.*

*A Rosilene de Almeida Casartelli, Diretora Técnica da Divisão de Serviços Básicos do Instituto Adolfo Lutz, pela compreensão e oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho.*

*A Profa. Dra. Júlia Baruque Ramos pelos ensinamentos, disponibilidade e pelas valiosas contribuições para a elaboração deste trabalho.*

*A Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola pelo convívio agradável, colaboração e sugestões que melhoraram o desenvolvimento deste projeto.*

*A Dra. Angela Faustino Jozala, pela amizade e por todas as sugestões que valorizaram este trabalho.*

*Aos colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pelo convívio e amizade.*

*A equipe do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Irene, Elza, Gledson, Juarez, Miriam e Ricardo e também aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Jorge e Elaine, pelos auxílios prestados.*

*A todos os professores, funcionários e estagiários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.*

*A FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.*

## RESUMO

ARAUZ, L. J. **Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator.** 2011. 148 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Nisina é um peptídeo antimicrobiano natural produzido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 durante a fase exponencial de crescimento. A bacteriocina é usada como conservante natural de alimentos, uma vez que mostra atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e esporos. Tem potencial aplicação em inúmeros campos (farmacêutico, veterinário e cosméticos). O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de crescimento bacteriano e a produção de nisina em biorreator, utilizando leite desnatado diluído, como um meio de cultura a baixo custo. Também foram avaliados os consumos de açúcar e proteína, formação de ácido láctico e adsorção de nisina nas células produtoras durante os processos de produção de nisina. Pré-cultivos com  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *Lactococcus lactis* foram cultivados em biorreator de 2 L contendo 25% de leite desnatado diluído em água (1,5 L, pH 6,7). Os ensaios foram desenvolvidos a 30°C por 52 horas, variando a agitação e aeração: (i) 200 rpm (0,0, 0,5, 1,0 e 2,0 L.min<sup>-1</sup>) e (ii) 100 rpm (0,0 e 0,5 L.min<sup>-1</sup>). A atividade de nisina foi avaliada pelo método de difusão em ágar, utilizando *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 como microrganismo sensível à ação de nisina. A melhor concentração de nisina (62,68 mg.L<sup>-1</sup> ou 2511,89 AU.mL<sup>-1</sup>), foi obtida em 16 horas, 200 rpm e sem aeração ( $k_{La} = 5,29 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). A adsorção de nisina nas células produtoras foram baixas (6,8 - 15,1%), quando comparadas com a atividade do sobrenadante. Estes resultados mostraram que o meio de cultivo composto por leite desnatado diluído favoreceu o crescimento celular e produção associada ao crescimento da nisina. Foram realizados estudos preliminares de liofilização (bioconservação) e purificação por cromatografia da nisina produzida em biorreator. A liofilização apresentou perda da atividade de nisina (24,8%), enquanto a purificação por cromatografia de interação hidrofóbica com resina Butyl-Sepharose, recuperou 40% da atividade da biomolécula, mostrando que ambos os processos poderão ser aplicados à bacteriocina.

Palavras-chaves: Lantibiótico. Antimicrobiano. Bacteriocina. Conservante de alimentos. Bactéria ácido láctica.

## ABSTRACT

ARAUZ, L.J. **Nisin production in diluted skimmed milk utilizing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 in bioreactor.** 2011. 148 f (Tese Doutorado)– Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Nisin is a natural antimicrobial peptide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 during its exponential growth phase. The bacteriocin is used as natural food preservative due to its antimicrobial activity against Gram-positive bacteria and outgrowth of spores. This property allows its application in numerous fields (pharmaceutical, veterinary and cosmetic). The aim of this work was to study the bacterial growth kinetics of *L. lactis* and respective nisin production in bioreactor, using diluted skimmed milk as an inexpensive medium. During the production, the consumption of sugar and protein, lactic acid formation and nisin adsorption on the producer strain cells were evaluated. Pre-cultivation with  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> of *L. lactis* were expanded in a 2 L bioreactor containing 25% diluted skimmed milk in water (1.5 L, pH 6.7). The assays were performed at 30°C for 52 hours, varying agitation and airflow rate: (i) 200 rpm (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 L.min<sup>-1</sup>) and (ii) 100 rpm (0.0, 0.5 L.min<sup>-1</sup>). Nisin activity was evaluated through diffusion assays using *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 as sensitive strain. The best nisin concentration (62.68 mg.L<sup>-1</sup> or 2511.89 AU.mL<sup>-1</sup>), was achieved at 16 hours, 200 rpm and with no airflow rate ( $k_{La} = 5.29 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). The quantity of nisin adsorbed by the producer cells were low (6.8 -15.1%) when compared to the quantity released in the supernatant. These results showed that diluted skimmed milk supported cell growth and growth-associated nisin. Preliminary assays of lyophilization (biopreservation) and purification by chromatography of nisin produced in bioreactor were performed. Lyophilization presented a loss of nisin activity (24.8%) while purification by hydrophobic interaction chromatography with Butyl-Sepharose column recovered 40% of the activity, showing that both processes can be applied to the bacteriocin.

Keywords: Lantibiotic. Antimicrobial. Bacteriocin. Food preservative. Lactic acid bacteria.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 2.1</b> - Esquema geral da fermentação da glicose pelas bactérias ácido lácticas.....	06
<b>Figura 2.2</b> - Representação esquemática da estrutura primária de nisina A, produzida por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454. Ala-S-Ala representa lantionina, Abu-S-Ala β-metil-lantionina, Dha dehidroalanina e Dhb dehidrobutirina.....	09
<b>Figura 2.3</b> - Mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I (nisina) e classe IIa (pediocina) em bactérias Gram-positivas.....	12
<b>Figura 4.1</b> - Vista superior do biorreator New Brunswick Scientific Bioflo 110.....	29
<b>Figura 4.2</b> - Vista lateral do biorreator New Brunswick Scientific Bioflo 110.....	30
<b>Figura 4.3</b> - Curva padrão relacionando as concentrações da atividade de nisina comercial com o diâmetro da área de inibição (zonas sem crescimento de <i>L. sakei</i> ), obtida usando o método de difusão em ágar, por meio de diluições de nisina em HCl 0,02 N. Equação $\log(\text{AU.mL}^{-1}) = 0,2408 \cdot (\text{Halo}) - 0,8745$ e $R^2 = 0,9806$ .....	37
<b>Figura 4.4</b> - Estruturas da lactose, galactose e glicose.....	39
<b>Figura 5.1</b> - Curvas de viabilidade celular ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) e atividade de nisina ( $\log \text{AU.mL}^{-1}$ ), com resultados experimentais e suavizados e curvas de pH e ácido láctico ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) experimentais do ensaio 1.....	44
<b>Figura 5.2</b> - Curvas de viabilidade celular ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) e atividade de nisina ( $\log \text{AU.mL}^{-1}$ ), com resultados experimentais e suavizados e curvas de pH e ácido láctico ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) experimentais dos ensaios 2 e 3.....	46
<b>Figura 5.3</b> - Curvas de viabilidade celular ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) e atividade de nisina ( $\log \text{AU.mL}^{-1}$ ), com resultados experimentais e suavizados e curvas de pH e ácido láctico ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) experimentais dos ensaios 4, 5 e 6.....	49
<b>Figura 5.4</b> - Curvas de viabilidade celular ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) e atividade de nisina ( $\log \text{AU.mL}^{-1}$ ), com resultados experimentais e suavizados e curvas de pH e ácido láctico ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) experimentais do ensaio 7.....	50
<b>Figura 5.5</b> - Curvas de viabilidade celular ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) e atividade de nisina ( $\log \text{AU.mL}^{-1}$ ), com resultados experimentais e suavizados e curvas de pH e ácido láctico ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) experimentais do ensaio 8.....	51
<b>Figura 5.6</b> - Curvas de viabilidade celular ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) e atividade de nisina ( $\log \text{AU.mL}^{-1}$ ), com resultados experimentais e suavizados e curvas de pH e ácido láctico ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) experimentais do ensaio 9.....	52
<b>Figura 5.7</b> - Curvas de atividade de nisina ( $\log \text{AU.mL}^{-1}$ ) extraída das células por solução ácida .....	56

- Figura 5.8** - Perfil cromatográfico da eluição de nisina em coluna de Butyl-Sepharose® por CIH, contendo solução tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 5,3 em gradiente salino de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 M, 1,5 M, 1 M e solução tampão. (---) Absorbância, (.....) Gradiente salino e (---■---) Atividade de nisina ( $\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )..... 59
- Figura 6.1** - Correlações entre  $k_L a$  e aeração. Os processos de aeração foram respectivamente: 200 rpm (•) (equação =  $-7,2103\cdot(\text{aeração})^2 + 16,6198\cdot(\text{aeração})$ ; e  $R^2 = 0,9905$ ) e 100 rpm (x) (equação  $k_L a = 7,2200\cdot(\text{aeração})$ ;  $R^2 = 1$ )..... 70
- Figura 9.2.1** – Curvas de  $\log \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$  versus  $\log \text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , com as linhas de tendência, equação e coeficiente de correlação..... 100

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

