



UNICAMP


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - FEA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Avaliação da Aplicação de Campos Magnéticos no
Processo de Obtenção de Nisina por *Lactococcus lactis*.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por David Chacón Alvarez, aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de abril de 2001.

Campinas, 20 de abril de 2001


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Presidente da Banca

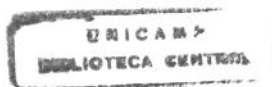
Autor: David Chacón Alvarez

Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Tese de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Campinas/SP

Abril de 2001



**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

200.114325

UNIDADE BC
N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
C344a
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 45245
PROC. 16-392101
C ☐ D ☒
PREC. R\$ 11,00
DATA 11/07/01
N.º CPD _____

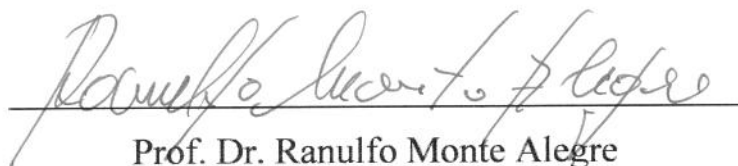
CM00158125-0

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

C344a Chacón Alvarez, David
Avaliação da aplicação de campos magnéticos no processo de
obtenção de nisina por *Lactococcus lactis* / David Chacón
Alvarez. – Campinas, SP: [s.], 2001.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Nisina. 2.Campo magnético. 3.Lactococcus lactis.
4.Bactericidas. I.Monte Alegre, Ranulfo. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador



Prof.ª Dr.ª Marta Cristina Teixeira Duarte
Membro



Prof.ª Dr.ª Lucia Regina Durrant
Membro

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
Membro

Dedico este trabalho aos meus queridos pais que, mesmo estando longe, sempre estiveram ao meu lado. Às minhas irmãs, principalmente a Dagmara e Francis, à minha esposa Juliana por seu amor, incentivo e dedicação. A eles dedico minha conquista, com profunda gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela iluminação e presença constante na minha vida.

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre pela orientação, confiança, amizade e dedicação a este trabalho.

A Universidade Estadual de Campinas (Brasil) e à Universidade de Oriente (Cuba), que me proporcionaram conhecimentos e crescimento profissional.

Ao convênio PEC-PG e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

A meus sogros, cunhados e demais familiares que sempre apoiaram esta justa causa.

Aos amigos e colegas de laboratório, pelo companheirismo e gratos momentos que passamos juntos.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões que melhoraram este trabalho.

ÍNDICE

NOMENCLATURA	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Nisina	4
2.1.1 Aplicações da nisina	4
2.1.2 Produção da nisina	7
2.2 Estudo e aplicações dos campos magnéticos na biotecnologia	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Microrganismo produtor de nisina	21
3.2 Microrganismo utilizado como teste para determinação da atividade de nisina	21
3.3 Preparo do Inóculo	22
3.4 Fermentação para produção de nisina	22
3.5 Tratamento magnético da suspensão celular	23
3.6 Planejamento Experimental	23
3.7 Métodos Analíticos	25
3.7.1 Determinação da atividade de nisina	25
3.7.2 Curva padrão	25
3.7.3 Metodologia de análise de atividade de nisina	25
3.7.4 Extração de nisina	26

3.7.5 Determinação de açúcares redutores totais (ART)	26
3.7.6 Determinação de massa celular seca	27
3.7.7 Determinação de pH	27
3.7.8 Determinação de Indução Magnética.	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÕES	40
6. RECOMENDAÇÕES	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8. APÊNDICE	48

NOMENCLATURA

X: Massa celular seca

ART: Açúcares redutores totais.

X₀: Massa celular seca no início da fermentação.

X_F: Massa celular seca no final da fermentação.

ΔX: Biomassa produzida durante a fermentação.

S₀: Açúcares Redutores Totais no início da fermentação.

S_F: Açúcares Redutores Totais no final da fermentação.

ΔS: Açúcares Redutores Totais consumidos durante a fermentação.

Y_(X/S): Rendimento Biomassa/Substrato.

Y_(P/S): Rendimento Produto/Substrato.

Y_(P/X): Rendimento Produto/Biomassa.

pH_F: pH no final da fermentação.

X₁: variável codificada para indução magnética.

X₂: variável codificada para tempo de tratamento magnético.

X₃: variável codificada para velocidade de reciclo da suspensão celular.

-1= Nível inferior.

0= Nível central.

1= Nível superior.

B: Indução magnética (Tesla).

t: Tempo de tratamento magnético (h).

v: Velocidade de reciclo da suspensão celular (m/s).

AT: Atividade de nisina (g de nisina/litro de meio)

AT_{esp}: Atividade específica de nisina (g de nisina/g de MS)

1 g de nisina pura = 40·10⁶ IU (Applin and Barret Ltd, Beaminster, UK).

RESUMO

No presente trabalho foi usado um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central para estudar o processo de obtenção de nisina a partir de *Lactococcus lactis sp.* com aplicação de campo magnético, utilizando como substrato, lactose na forma de permeado de soro de queijo.

A Nisina é a única substância antibacterial com “status” legal produzida a partir de bactérias lácticas. É amplamente utilizada em conservação de alimentos, bebidas e produtos enlatados e seu uso é permitido em 47 países, incluindo o Brasil. Embora o seu uso tenha sido inicialmente restrito a alguns tipos de queijos pasteurizados, pesquisas recentes encontram novas aplicações na medicina e na veterinária.

Baseados em experiências anteriores obtidas com a aplicação de técnicas do Bioeletromagnetismo em processos fermentativos, foi aplicado o campo magnético no processo de obtenção de nisina. Foram avaliados os efeitos dos fatores: indução magnética (B), tempo de tratamento magnético (t) e velocidade do reciclo celular (v) no rendimento do bioprocessos.

A utilização do campo magnético neste processo permitiu aumentar os níveis de produção de biomassa em 1,66 vezes e a produção de nisina de 2,42 a 2,75 vezes, quando comparado com o processo convencional. As variáveis estudadas no processo exibiram comportamento não linear.

ABSTRACT

In the present work a 2^3 complete factorial design with central point was used to study the process of nisina obtention using *Lactococcus lactis* sp. with application of magnetic field, using as substrate, lactose in the form of cheese whey permeate.

Nisina is the only antibacterial substance with "legal status" produced from lactic bacteria. It is used thoroughly in conservation of victuals, drinks and canned products and its use is allowed in 47 countries including Brazil. Although its use has been initially restricted for some types of pasteurized cheeses, recent researches find new applications in the medicine and the veterinary.

Based on previous experiences obtained with the application of techniques of Bioelectromagnetism in process fermentative, the magnetic field was applied in the process of nisina obtention. The effects of the factors: magnetic induction (B), time of magnetic treatment (t) and flow rate in the recycle cellular (v), were evaluated in the yield of the bioprocess.

The use of the magnetic field in this process allowed to increase the levels of biomass production in 1,66 times and the nisina production from 2,42 to 2,75 times, when compared with the conventional process. The variables answers studied in the process exhibited non linear behavior.

1. INTRODUÇÃO

Fermentação é todo processo em que atuam microrganismos sobre substratos orgânicos, através de suas enzimas, produzindo determinadas substâncias ou substratos modificados de utilidade para o homem.

Essas substâncias ou produtos de fermentações vão desde bebidas alcoólicas (cerveja, vinho) e alimentos modificados como laticínios variados (coalhada, iogurte, queijo), a outros produtos industriais, como combustíveis e solventes (etanol, acetona), ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico), ésteres, aminoácidos, polissacarídeos, enzimas, vitaminas, hormônios e antibióticos.

Lantibióticos são grupos de peptídios com função de antibióticos, que são produzidos por bactérias Gram-positivas e apresentam alta atividade antimicrobiana. Estes são ditos estritamente bactericidas, caracterizados como proteínas ou complexos protéicos. Bacteriocina é um composto proteináceo (usualmente um peptídeo), que tem ação antibacteriana contra uma faixa limitada de organismos.

O termo lantibióticos foi introduzido como uma abreviação da lantionina contendo peptídios que exercem função de antibióticos, e refere-se às características mais proeminentes deste grupo, que são a forte atividade antimicrobiana e os anéis intramoleculares. A presença destes resíduos influencia a estrutura e atividade dos peptídios que tem recentemente atraído o interesse em campos de diferentes pesquisas básicas. Dentre as bactericidas, encontra-se a nisina, que foi descrita em 1928 e caracterizada e isolada em 1940, a qual mostra uma alta especificidade contra diversos microorganismos, sendo útil no controle destes em alimentos fermentados.

Várias cepas de bactérias lácticas produzem proteínas ou complexos protéicos bactericidas, as quais inibem uma faixa limitada de microrganismos patogênicos e esporulados, e por essa razão são potencialmente úteis como preservativos de alimentos naturais. Para esse fim, eles podem ser produzidos "*in situ*" por bactéria iniciadora ou em fermentador e adicionado ao alimento.

A produção de nisina em culturas contínuas ou bateladas tem sido estudada por vários autores (HIRSH, 1951; HURST, 1966; MEGHROUS, et al. 1992; DE VUYST & VANDAMME, 1992 e 1993; WAN et al. 1995).

A conservação de alimentos para controle de microorganismos nocivos tem como objetivo fundamental minimizar o risco de consumidores contraírem doenças através de alimentos e prevenir ou diminuir a contaminação microbiana que pode deteriorar ou desenvolver sabor desagradável no alimento. O lantibiótico nisina é um conservante amplamente utilizado na indústria de alimentos e seu uso foi aprovado pela FAO em mais de 40 países, diminuindo o uso de conservantes artificiais.

Uma das desvantagens do uso da nisina é o fator econômico, em virtude do que hoje a maioria das pesquisas envolvidas com a produção de nisina estão direcionadas para diminuir os custos de sua produção e assim aumentar sua aceitação e suprir a demanda das grandes empresas produtoras de alimentos.

A eletroestimulação é um método estabelecido na medicina há muitos anos, porém, a aplicação da mesma aos processos de fermentação na biotecnologia é um desenvolvimento recente. Apesar das muitas publicações e patentes neste assunto, poucas aplicações em escala industrial tem sido reportadas. A eletroestimulação na Biologia foi revisada por BERG (1993) citado por KERNS et al. (1993). Os efeitos do campo magnético de baixa frequência nos sistemas biológicos têm sido reportados por diferentes pesquisadores, com resultados positivos no tratamento de doenças dos ossos e da pele. Outros estudos com microrganismos mostraram acelerações ou inibições do crescimento dos mesmos (IVANOVA et al.,1996; RAJA et al.,1997).

Uma das razões pela qual a eletroestimulação é raramente aplicada aos processos de fermentação, é devido a seus complicados mecanismos, bem como ao desconhecimento das condições limites no nível molecular da maioria dos processos de fermentação, particularmente naqueles que envolvem sínteses de produtos extracelulares. Acredita-se que os resultados contraditórios e a falta de reprodutibilidade são problemas típicos nas pesquisas com campos eletromagnéticos (CE), e as diferenças nos resultados obtidos pelos diferentes pesquisadores podem ser causadas pelos planejamentos experimentais usados, linhagens, tempo de exposição, sistema usado para a geração do CE, métodos de detecção

do campo eletromagnético, dentre outros (MITTENZWEY et al., 1996).

Os objetivos fundamentais deste trabalho foram:

- Estudar a produção de nisina por *L. lactis* sp. com aplicação de campos magnéticos, utilizando um substrato de baixo custo (permeado de soro de queijo).
- Estudar a cinética de fermentação através de curvas de crescimento celular, consumo de substrato, atividade de nisina e rendimentos do processo.
- Avaliar a influencia do campo magnético no processo de produção de nisina em função dos parâmetros do campo magnético estudados: Indução magnética (B), tempo de tratamento magnético (t) e velocidade do reciclo celular (v).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nisina

A nisina foi descrita em 1928 e isolada e caracterizada em 1940. Bactérias lácticas produzem metabólitos tais como: ácido láctico, substâncias antibióticas e proteínas antimicrobianas ou bacteriocinas. De todas as proteínas antimicrobianas a nisina é a mais estudada pelas suas propriedades e grande potencialidade na conservação e preservação em alimentos (HURST, 1981; LIU et al., 1990 & DELVES-BROUGHTON, 1990).

2.1.1. Aplicações da nisina

HIRSH (1951) selecionou o microorganismo *Streptococcus lactis* 354/07 como bom produtor de nisina. O autor utilizou meio de cultura básico contendo 1% peptona, 2,5% glicose, 1% lab. lemco, 1,5% acetato de sódio e 0,6 µg/mL de pantotenato de cálcio. Este autor estudou o efeito do pH, adição de vitaminas, neutralização periódica e adição de tampão ao meio de cultura para produção de nisina. O valor de pH inicial do meio (pH 7,0) decresceu para o valor de 4,6 após 24 horas. A nisina obtida permaneceu estável por 10 dias em temperatura ambiente neste pH, e mostrou maior estabilidade em pH baixos. A produção de nisina aumentou pela neutralização do meio, e a adição de pantotenato foi mais efetiva no aumento de produção do que quando se usou uma mistura de vitaminas do complexo B ou extrato de fígado. Os tampões citrato e acetato foram mais efetivos que o tampão fosfato para aumento de sua produção.

HURST (1966) desenvolveu um trabalho usando *Streptococcus lactis* com o objetivo de verificar se a síntese de nisina era um processo ribossômico ou enzimático. Avaliou o efeito da adição de aminoácidos, penicilina, cloranfenicol e cicloserina ao meio de cultura, tendo constatado que a síntese da nisina ocorre por um mecanismo similar à síntese de proteínas normais.

A relação de duração da fase lag de crescimento com a síntese de nisina e outras proteínas básicas por *Streptococcus lactis* foi estudada por HURST & DRING (1968), sob diferentes condições de cultura. Dois meios foram usados: o meio 22 (HURST, 1966) altamente tamponado e meio destamponado (LTB), ambos com e sem controle de pH.

Preocupações com os altos níveis de nitrito em carne curada tem levado vários pesquisadores a considerar sistemas de conservação alternativa, que incluem a redução dos níveis de nitrito e a adição de nisina (CASERIO et al., 1979; RAYMAN et al., 1981). Utilizando altas concentrações de nisina, os autores obtiveram bom controle do crescimento de *Clostridium botulinum* e resultados mais encorajadores foram obtidos em carnes e salsichas curadas e embaladas à vácuo, onde o fator limitante para a vida de prateleira pode ser o crescimento da bactéria ácida láctica deteriorante.

A nisina tem um grande potencial no controle da contaminação de cerveja por bactérias lácticas (OGDEN, 1986 e 1987) e vinho (RADLER, 1990a e 1990b), uma vez que estas são sensíveis ao lantibiótico e as leveduras não. Suas aplicações na indústria de cerveja abrangem: adição nos fermentadores para prevenir ou controlar contaminação, lavagem das leveduras para eliminar bactérias contaminantes e evitar a lavagem ácida que afeta a viabilidade da levedura, redução dos processos de pasteurização e aumento da vida de prateleira da cerveja. Aplicações similares ocorrem na indústria de vinhos, porém a nisina não pode ser usada na fermentação do ácido maloláctico.

Nisina também pode ser usada na produção de álcool destilado, tanto para manufatura de bebidas como de álcool industrial. A biomassa de leveduras usada na fermentação contem geralmente, contaminação de bactérias lácticas e a atividade destas pode ser controlada, o que resulta num aumento na produção de álcool (HENNING et al., 1986b).

A adição de nisina em vegetais enlatados de baixa acidez pode facilitar estocagens prolongadas destes produtos em temperaturas ambientais quentes, uma vez que ela evita a germinação de esporos de *Bacillus stearothermophilus* e *C. thermosacharoyticum*, que são resistentes ao calor. O uso de nisina permite a redução do tempo de esterilização sem aumentar o risco de deterioração termofílica. Bactérias deteriorantes de alimentos ácidos (pH abaixo de 4,5) restringem-se as espécies não-patogênicas, resistentes ao calor e acidúricos, formadoras de esporos tais como: *Clostridium pasteurianum*, *Bacillus macerans* e *Bacillus coagulans*, que podem ter o crescimento controlado por nisina. (DELVES-BROUGHTON, 1990)

A primeira aplicação da nisina em alimentos foi como conservante de queijos processados, que continua a ser sua principal aplicação atualmente. Esporos de espécies de *Clostridium* freqüentemente estão presentes nestes produtos e são capazes de sobreviver a tratamentos térmicos de 85-105°C por 6 a 10 minutos, como no processo de fusão de queijo. As concentrações de nisina necessárias para alcançar conservação efetiva dependem dos seguintes fatores: a carga de esporo presente na formulação, conteúdo de umidade, pH, conteúdo de sais, uso de aditivos aromatizantes, processos de cozimento empregados e a temperatura e duração da vida de prateleira requerida. Níveis usados para prevenir deterioração variam de 5 a 20 µg/g, enquanto que para proteção contra *C. botulinum* são necessários 12,5µg/g ou mais. Em locais com temperaturas ambientais altas ou sistemas de refrigeração inadequados, a nisina pode ser empregada em leites pasteurizados a níveis de 0,625 a 1,25 µg/g para aumentar a vida de prateleira. Conservação efetiva de leites pasteurizados e sobremesas lácteas foram reportadas usando níveis de 2,5 a 3,75 µg/g (DELVES-BROUGHTON, 1990).

Produtos de ovos (inteiro, gema e clara) são pasteurizados (62 a 65°C por 2 a 3 minutos) para assegurar a destruição de *Salmonella*. Entretanto, tais tratamentos são insuficientes para matar esporos e células vegetativas de algumas espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas. As bactérias sobreviventes são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração, o que reduz a vida de prateleira destes produtos. O uso de nisina a níveis de 2,5 a 5 mg/L tem demonstrado bom efeito conservante, aumentando a vida de prateleira e melhorando a proteção contra o crescimento de *B. cereus*. A nisina é mais efetiva em claras líquidas quando comparadas com gemas líquidas, pois os fosfolipídeos presentes na gema interferem no seu modo de ação. A combinação de lizozima e nisina proporciona um espectro bacteriostático maior, comparado com o uso de um só agente antimicrobiano (DELVES-BROUGHTON et al., 1992).

A nisina também mostra bom potencial como agente terapêutico em mastite bovina, que é comumente tratada pela administração de antibióticos. Durante a lactação, entretanto, este tratamento tem baixas taxas de cura e resíduos de drogas podem causar prolongados períodos de retenção (resistência). A nisina é fortemente bactericida contra mastite patogênica (*Staphylococcus e Streptococcus*). Em estudos experimentais, altas taxas de cura

de infecções intramamárias, provocadas pela inoculação intramamária ou por exposição da teta a microorganismos patogênicos, (66% de *Staphylococcus aureus*, 95% de *S. agalactiae* e 100% de *Streptococcus uberis*), foram alcançadas com apenas três tratamentos em intervalos de 12 horas, o que sugere que formulação apropriada de nisina deve ser útil contra infecções intramamárias bovinas (DELVES BROUGHTON, 1996).

Um grande número de aplicações para higiene oral estão sendo exploradas . Um rinse bucal baseado em nisina foi testado em um tipo de cão lebreiro e constatou-se que este previne a formação de placas bacterianas e a inflamação gengival (HOWEL, 1993 citado por DELVES BROUGHTON, 1996). A alta sensibilidade de *Streptococcus* e *Staphylococcus* à nisina oferecem aplicações tais como: infecções tópicas da pele e infecções sistêmicas com tratamentos de múltipla resistência a drogas (MRSA).

Com a crescente preocupação em relação a listeriose, tem-se investigado o uso de nisina como agente bactericida ou bacteriostático contra *Listeria monocytogenes*. É evidente que as condições que resultam em ação bactericida da nisina diferem daquela que exerce ação bacteriostática. Vários pesquisadores tem demonstrado uma redução inicial do número de *Listeria*, que pode ser alcançado pela aplicação de nisina em meio microbiológico. Mas, como consequência de incubação prolongada, *Listeria* pode continuar crescendo e alcançar níveis de população similares aos do controle (DELVES-BROUGHTON, 1996).

No Brasil, a nisina é considerada como um potente antibiótico, resistente a altas temperaturas, podendo resistir à temperatura de 100°C por 5 minutos. É usada para combater esporos de *Clostridium butyricum* e/ou *C. tyrobutyricum* que se protegem da pasteurização e do aquecimento na fabricação de requeijão a 90°C, formando esporos. Sua dosagem, de acordo com a legislação, é de 12,5 mg de nisina/Kg de alimento (ANÔNIMO, 1999).

2.1.2. Produção da nisina.

LIU & HANSEN (1990) determinaram o efeito do pH na solubilidade da nisina e acharam que a solubilidade e estabilidade da nisina aumentam significativamente quando o pH é baixo, sendo que a pH 2 ela é estável e pode ser autoclavada sem riscos de desativação. Num estudo realizado entre pH 2 e 12 , observaram que a concentração de

tampão fosfato usada afeta a solubilidade da nisina sendo a atividade inversa e linearmente proporcional à concentração do tampão. Nisina foi também estocada sob refrigeração por seis meses em 0,5 % de TFA e pH 2,2 sem ter sido detectadas mudanças químicas ou biológicas. Os autores conhecem que a nisina é instável com o aumento do pH, porém desconhecem o mecanismo de desativação e atribuem que poderia ser uma consequência da desnaturação, das modificações químicas ou da combinação de ambas. Depois de terem realizado alguns testes chegaram à conclusão que a desativação da nisina a elevados valores de pH não é devido a uma simples desnaturação.

O microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NCK 293 (resistente a nisina) e o produtor de nisina *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCK 401, foram fermentados separadamente e combinados para produção de nisina em fermentação padrão de “sauerkraut”. As linhagens foram geneticamente marcadas e seletivamente enumeradas pelo uso de meios contendo antibiótico. O crescimento e sobrevivência de *L. mesenteroides* foi similar na presença e ausência de *L. lactis* subsp *lactis*. O crescimento de *L. lactis* subsp *lactis* não foi inibido, embora a densidade celular máxima tenha sido menor e o decréscimo da população tenha sido mais pronunciado na presença de *L. mesenteroides*. Nisina foi detectada após 24 horas de fermentação e sua concentração permaneceu constante por um período de 12 dias. A concentração máxima de células e nisina alcançada foi alterada pela mudança nas razões de concentração inicial de células de *L. mesenteroides* e *L. lactis* subsp *lactis* (HARRIS et al., 1992).

MEGHROUS et al. (1992) estudaram a produção de nisina por *L. lactis* subsp *lactis*, usando lactose como fonte de carbono. Culturas contínua e em batelada limitadas por lactose tiveram atividades máximas de nisina em valor de μ (taxa específica de crescimento celular) entre 0,2/h e 0,3/h. A taxa máxima de crescimento específico obtido no meio usado foi 0,6/h e a atividade máxima de nisina a μ igual 0,25/h (160AU/mL) foi 9 vezes maior, quando comparada com a atividade obtida com taxa de diluição de 0,05/h ou 0,4/h. Com taxa constante de diluição de 0,25/h e variando a concentração inicial de lactose de 3 a 40g/L, observaram um aumento na biossíntese de nisina com aumento da concentração de lactose e altas taxas de consumo de açúcar. Em valores maiores de μ a produção de nisina diminuiu, indicando que a biossíntese da nisina é regulada por um sistema de repressão e

depressão. Adição dos precursores lantionina e β -metilantionina ao meio diminuíram a atividade de nisina, quando treonina, treonina-cisteína ou cisteína-serina-treonina foram adicionadas ao meio usando taxa de diluição de 0,25/h.

A influência da fonte de carbono na produção de nisina por *L. lactis* subsp *lactis* em fermentações em batelada foi estudada, usando-se um meio complexo (DE VUYST & VANDAMME, 1992). A produção de nisina mostrou-se associada à de biomassa, sendo sua atividade detectada após 4 horas de crescimento. A atividade máxima foi obtida no final da fase exponencial, quando a concentração de biomassa no meio de cultura era máxima. Neutralização de ácido láctico pela adição contínua de NaOH 10M aumentou a produção de biomassa, bem como a atividade da nisina. Em fermentações prolongadas observou-se que os valores máximos de nisina e biomassa decresceram rapidamente após o tempo de 8 horas, particularmente em fermentações de pH controlado. Uma vez que a atividade da nisina parece estar associada à produção de biomassa, especialmente em condições de pH controlado, a obtenção de alta produção de biomassa pode ser um pré-requisito para a alta produção de nisina. Os autores observaram que com uma concentração inicial de 20g/L de sacarose o nível máximo de biomassa foi aumentado 1,5 vezes quando comparada com fermentações usando 10g/L de sacarose. Entretanto isto não prolongou a fase de crescimento ativo e aumentou a atividade de nisina em apenas 20%. Altas concentrações de sacarose (maiores que 20g/L) produziram altas concentrações de biomassa, mas não aumentaram a atividade de nisina. Os autores concluíram, que existe uma relação não linear entre produção de biomassa e de nisina, obtendo uma produtividade específica de nisina de 19mg nisina/g de massa seca, quando usaram sacarose em concentração de 10 g/L. Estes resultados sugerem que a biossíntese de nisina é regulada pela fonte de carbono.

DE VUYST & VANDAMME (1993) estudaram a influência de diferentes fontes de fósforo e nitrogênio no crescimento de *L. lactis* subsp *lactis* NIZO 22186, para a produção de nisina em fermentações em batelada usando meio complexo. O sal KH_2PO_4 foi selecionado como melhor fonte de fósforo para a produção de nisina. Aumentando a concentração inicial de fosfato de 0 até 5%, este exerceu duplo efeito: criando condições favoráveis de pH e estimulando os níveis de produção de nisina, cuja concentração mais alta foi obtida com 5% de KH_2PO_4 . Não havia sido reportado ainda nenhum outro

antibiótico ou bactericida, com necessidade de concentrações iniciais de fosfato tão altas para sua produção. Nisina, que é um peptídeo antibiótico contendo lantionina com propriedades bactericidas, demonstrou ser um metabólito primário, já que sua formação foi correlacionada com crescimento ativo e não foi reprimida com concentrações de fosfato superiores a 5%.

DE VUYST (1994) estudou diferentes linhagens de *L. lactis* quanto à suas capacidades de produzirem nisina e verificou que os níveis de produção variaram drasticamente. As linhagens foram selecionadas de acordo com sua habilidade em fermentar carboidratos (glicose, sacarose ou lactose), pela habilidade em produzir nisina, atividade de protease e imunidade à nisina. Os melhores produtores entre as diferentes linhagens de *L. lactis* subsp *lactis* foram ATCC 2054 (1582 UI/mL), LDV 22186 (1850 UI/mL), NCFB (1835 UI/mL) e NIZO 22186 (1886 UI/mL). Todas estas mostraram resultados positivos quanto à habilidade de fermentar carboidratos para as três fontes testadas.

A influência de vários fatores na produção de nisina por *L. lactis*, pediocina ACh por *Pediococcus acidilactici*, leuconicina Lcm1 por *Leuconostoc carnosum* Lcm1 e sakacina A por *Lactobacillus sake* Lb706 foram estudados por YANG & RAY (1994). Das linhagens utilizadas apenas algumas induziram a produção de altas quantidades de bactericidas. Constatou-se que a produção de bactericidas em meio simples pode ser aumentada pelo aumento da produção de células em pH ótimo, e suplementação com nutrientes específicos para a espécie/linhagem. Foi observada alta produção de nisina com o aumento de concentrações de glicose ou sacarose, incluindo acetato, citrato, fosfato e ácido pantotênico. As linhagens foram inoculadas em pH inicial de 6,8 e a concentração máxima de nisina foi obtida a pH 5,8. A produção dos quatro bactericidas foi maior quando se usaram fermentadores no lugar de frascos agitados. Em geral, para os quatro bactericidas, as condições que produziram alta densidade de células também proporcionaram alta produção de bactericida. Sob pH controlado a taxa de produção de nisina, leuconocina Lcm1 e sakacina A é associada à taxa de crescimento e alcança altos níveis na fase de crescimento estacionário. Observou-se que a produção de bactericidas por bactérias lácticas foi fortemente influenciada por diferentes linhagens, composição do meio, pH final e tempo de incubação sob condições ótimas de temperatura. Meios simples e

econômicos tais como TGE (tripticase 1%, glicose 1% , extrato de levedura 1%, Tween 80 0,2% e MgSO_4 e MnSO_4 0,005%, pH 6,8) e TGE tamponado (TGE suplementado com acetato e citrato de sódio 0,5% cada e KH_2PO_4 0,05%), com ingredientes de grau alimentício podem ser utilizados para a alta produção de bactericidas.

TANIGUCHI et al. (1994) estudaram a produção contínua do polipeptídeo antibiótico nisina de *L. lactis*, usando um bioreator de 0,7 litros acoplado a um módulo de microfiltração onde controlaram o pH e borbulharam nitrogênio a uma taxa de 0,02 V.V.M. para manter condições anaeróbias. Observaram que o crescimento cessou após 7 horas, porém o ácido láctico continuou a acumular, o que pode ter sido uma das razões para o decréscimo da taxa de crescimento celular. A concentração final de células obtidas foi de 3,3 g de células seca/L e a produção de nisina atingiu atividade máxima de $1,15 \times 10^5$ UI/L em 6 horas de fermentação. Quanto ao efeito da concentração inicial de ácido láctico e glicose, observaram que *L. lactis* produziu nisina em meio sem glicose e com menos do que 20 g/L de ácido láctico.

DE VUYST (1995) estudou os fatores nutricionais que afetam a produção de nisina por *L. lactis* subsp *lactis* NIZO 22186 em um meio sintético contendo oito aminoácidos (ácido glutâmico, metionina, valina, leucina, treonina, arginina, isoleucina e histidina), cinco vitaminas (biotina, pantotenato de cálcio, ácido nicotínico, peridoxina e riboflavina), fosfato hidrogênio dissódico, cloreto de sódio, sulfato de magnésio e citrato dissódico. Constatou-se que a biossíntese de nisina é fortemente dependente de sulfato de magnésio ou tiosulfato de sódio e dos aminoácidos metionina, cisteína e cistationina. Os aminoácidos serina, treonina e cisteína estimulam a produção de nisina sem afetar a produção das células, indicando serem bons precursores da biossíntese de nisina. Produção de nisina neste meio foi de 370 UI/mL e 1800 UI/mL em meio complexo.

Um total de 4608 bactérias lácticas foram isoladas de 24 salsichas fermentadas e selecionadas quanto à capacidade de produzir bactericidas. Dois tipos, BB24 e 618, produziram bactericidas que inibiram um largo espectro de bactérias Gram-positivas. Estes microorganismos foram identificados como *L. lactis* por fermentação padrão de carboidrato e por outras características bioquímicas. Pela caracterização dos bactericidas sugeriu-se que ambos deveriam ser o lantibiótico nisina, que foi confirmado por análises de PCR de seu

DNA genômico. A nisina produzida por *L. lactis* BB24 foi purificada por precipitação com sulfato de amônia e troca catiônica, interação hidrofóbica e cromatografia por fase reversa, mostrando ser um procedimento de purificação simples, rápido e reprodutível (RODRIGUEZ et al., 1995).

Bactericidas tais como brevicina 286, nisina e pediocina PO₂ foram produzidos com sucesso usando células imobilizadas de *Lactococcus brevis* VB286, *L. lactis* subsp *lactis* e *Pediococcus acidilactici* PO₂, respectivamente, encapsuladas em pérolas de alginato cálcico. A produção de brevicina com células de *Lactococcus brevis* VB286 imobilizadas em fermentação contínua, em pH ótimo, foi 150% maior do que a fermentação com células livres. Células imobilizadas de *L. lactis* subsp *lactis* e *P. acidilacti* PO₂ em fermentação contínua produziram de nisina e pediocina concentrações equivalentes às fermentações com células livres. A remoção de fosfato, acetato, citrato e a adição de 10nmol/l de CaCl₂ no meio melhorou a estabilidade física das pérolas de alginato (WAN et al., 1995).

MATSUSAKI et al. (1995) isolaram o microrganismo *L. lactis* IO-1 e verificaram que o mesmo produzia um derivado de nisina que foi designado como Nisina Z. Este bactericida apresentou propriedades similares às de nisina comercial (denominada nisina A). Nisina Z se diferencia de nisina A pela substituição de histidina (nisina A) por asparagina na posição 27. A nisina Z purificada, mostrou atividade específica de 122 vezes superior a do material padrão e a recuperação foi de 24 %.

MATSUSAKI et al. (1996) estudaram a influência de vários fatores na produção de nisina Z por fermentação de *L. lactis* IO-1, determinando que as melhores condições para sua produção eram 30 °C e pH entre 5 e 5,5 . Apesar de terem encontrado a glicose e sacarose como melhores fontes de carbono, recomendaram usar xilose em estudos posteriores pela sua abundância em forma de resíduos agrícolas na natureza, e por ter causado uma alta velocidade na produção da nisina Z, ainda que em concentrações mais baixas quando comparadas com as obtidas com glicose ou sacarose. A adição de Ca²⁺ ao meio de cultura mostrou um efeito positivo na produção da nisina Z. Durante uma fermentação em batelada simples com pH controlado, e meio suplementado com 0,1 M CaCl₂, obteve-se uma atividade máxima de 3150 UI/mL depois de 15 horas de fermentação,

superior em 2,5 a 3,4 vezes àquela obtida em condições experimentais testadas anteriormente.

Em 1997a, CHINACHOTI et al. estudaram a produção de nisina Z usando fermentação contínua e imobilização de células. Tanto as células livres, como as células adsorvidas em gel ENTG-3800 demonstraram alta produtividade a altas taxas de diluição. Nenhum aumento foi verificado na produtividade, quando realizaram fermentações contínuas com alta densidade celular. Nisina Z foi separada usando vários tipos de absorventes incluindo Amberlite IR-1203, Sephadex C-25, Celite e cartucho Sep Pak.

Ainda em 1997b, CHINACHOTI et al. estudaram a relação entre a produção de nisina Z e condições de aeração usando *L. lactis* IO-1. Os autores usaram xilose e glicose como fonte de carbono e realizaram fermentações em frascos agitados e fermentador. Quando usaram frascos agitados e agitação no intervalo de 120 a 410 rpm, constataram que a máxima atividade foi alcançada as 21 horas de fermentação e 340 rpm. Posteriormente, utilizaram velocidade de agitação de 120 a 1000 rpm no fermentador determinando que, o aumento da velocidade de agitação não teve efeito significativo no crescimento celular, produção de lactato e consumo de substrato (glicose). De outro modo, a produção de nisina Z aumentou gradualmente com o aumento da velocidade de agitação até 320 rpm. Velocidades de agitação maiores resultaram em baixa produção de nisina Z.

Em 1998, MATSUSAKI e colaboradores fizeram uma caracterização da produção de nisina Z, constatando que a mesma é estável ao calor e pH ácido exercendo ação bactericida contra o microrganismo teste *Bacillus subtilis* C1. Também estudaram o efeito do tratamento com enzimas proteolíticas na atividade de nisina e no espectro antimicrobiano determinando que, as variantes nisina A e nisina Z têm características bastantes similares, sendo ambas praticamente inativadas pelas enzimas proteinase K e actinase E. O crescimento da bactéria *Escherichia coli* foi inibido por altas concentrações de nisina, embora bactérias gram negativas serem geralmente resistentes a nisina.

CHINACHOTI et al (1998) usaram xilose como fonte de carbono na fermentação de *L. lactis* IO-1 e constataram que o consumo de açúcar foi 20% superior as fermentações onde foi utilizada glicose. As condições ótimas para a produção de nisina Z foram 4% de xilose a pH 6,0 e 37°C. Com a adição de CaCl_2 conseguiram aumentar a produção

específica de nisina em 1,5 vezes, mas não constatou-se diferença no crescimento celular, produção de ácido láctico e consumo de xilose.

AMIALI et al. (1998) utilizando o microrganismo *L. lactis* UL719, permeado de soro de queijo como substrato e fermentações com aeração, obtiveram alta atividade de nisina Z. Suplementaram o permeado de soro de queijo com extrato de levedura e Tween 80 e estudaram a influência de pH controlado (5,0 a 6,5) e o nível de oxigênio dissolvido (0 a 90% de saturação de ar) na produção de nisina. A atividade de nisina total (ligada às células e do sobrenadante) foi 50% menor em pH 5,0 do que na faixa de pH de 5,5 a 6,5, embora a produção específica diminuísse com o aumento de pH. Após 8 horas de fermentação foi observada a máxima atividade (4100 IU/mL) no sobrenadante em um intervalo de pH de 5,5 a 6,5. Após 12 horas de fermentação constatou-se um decréscimo na atividade em pH 6,0 a 6,5, mas não teve o mesmo comportamento em pH 5,0 ou 5,5. A aeração aumentou a atividade total e ligada à célula nos valores 20500 e 16400 IU/mL, respectivamente, para 60% de saturação de ar após 24 horas de fermentação a pH 6,0. A produção específica com 60% ou 90% de saturação de ar foi oito vezes maior que a 0%.

Em 1999, GOULHEN et al. estudaram a produção de nisina Z e pediocina em fermentação com cultura mista, pH controlado e utilizando permeado de soro de queijo suplementado. Utilizaram o *L. lactis subsp lactis* biovariante *diacetylactis* UL719 (produtor de nisina) e a variante T5 de *Pediococcus acidilactici* UL5 (produtor de pediocina), resistente a altas concentrações de nisina. A cultura mista foi incubada a 37°C e pH 5,5. Primeiramente a variante T5 foi inoculada e após oito horas de fermentação foi inoculada *L. diacetylactis* UL719, sendo que a cultura mista foi comparada com a cultura pura de cada microrganismo. Após 16 e 18 horas de fermentação foram obtidas altas produções, com atividades de 730 e 3000 AU/mL para nisina e 1360 e 1060 AU/mL para pediocina, respectivamente. Quando usou-se as culturas puras a produção de nisina Z e pediocina foram superiores a da cultura mista, a máxima atividade foi obtida após 10 horas de fermentação com aproximadamente 10000 AU/mL (250 mg/L de nisina pura) e 2500 AU/mL (190 mg/L de pediocina pura).

SHIMIZU e colaboradores (1999) produziram nisina num sistema de cultura mista composto por *L. lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, com o objetivo de obter um controle

natural de pH, sendo que o microrganismo *K. marxianus* assimila o lactato produzido por *L. lactis*. Para isto, os autores investigaram a cinética de crescimento e o consumo de ácido láctico por *K. marxianus*. Devido ao fato do pH ter ficado constante (a concentração de lactato permaneceu baixa), houve um acúmulo de nisina obtendo uma alta produção quando comparada com fermentações que usaram estratégias convencionais de controle de pH, tais como adição de base.

No ano 2000, FLÔRES realizou um estudo em frascos agitados utilizando diferentes microrganismos produtores de nisina e diferentes meios de cultura. Os resultados alcançados mostraram que o melhor produtor entre as espécies testadas foi o *Lactococcus lactis* ATCC 7969, obtendo uma concentração de $6,19 \times 10^{-5}$ g de nisina/mL de meio de cultura quando cultivado em permeado de soro de queijo. O meio de cultura que obteve a maior concentração de nisina foi o que usou permeado de soro de queijo como fonte de carbono, contendo a seguinte composição: 10 g/L de lactose, 10 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de fosfato de potássio, 2 g/L de NaCl e 0,2 g/L de sulfato de magnésio (pH = 6,8). Posteriormente realizou diferentes ensaios de 24 horas cada em fermentador de bancada, obtendo os maiores valores de atividade na 9ª hora de fermentação (132×10^{-6} g de nisina/mL de meio ou 5280 IU/mL de meio) e sem controle de pH. Outros resultados mostraram que concentrações de lactose superiores a 8 g/L, inibiram o crescimento microbiano e a produção de nisina. Tanto as fermentações airadas, como aquelas com pH controlado, influenciaram significativamente na produção de biomassa, não tendo o mesmo efeito na produção de nisina.

2.2. Estudos e aplicações dos campos magnéticos na biotecnologia.

Diversos pesquisadores fizeram uma recompilação bibliográfica dos efeitos dos campos eletromagnéticos nos sistemas biológicos e chegaram à conclusão de que a eletroestimulação é um método estabelecido na medicina há muitos anos. Porém a aplicação da mesma nos processos de fermentação e na biotecnologia é um acontecimento recente. Apesar das muitas publicações e patentes neste campo, somente umas poucas aplicações em escala industrial tem sido reportadas. A eletroestimulação na biologia tem sido revisada por BERG (1993) citado por KERNS et al. (1993). Exemplos da eletroestimulação na biotecnologia são: o incremento na formação de CO₂ por

Saccharomyces cerevisiae, e a influência das correntes pulsáteis induzidas eletromagneticamente na produção do antibiótico Nourseothricin de *Streptomyces Noursei*. Uma das razões pela qual a eletroestimulação é raramente aplicada aos processos de fermentação é devido aos complicados mecanismos envolvidos, bem como ao desconhecimento das condições limites no nível molecular da maioria dos processos de fermentação, particularmente naqueles que envolvem sínteses de produtos extracelulares.

BLANK (1993) discutiu alguns sistemas, enfocando a aplicação de campos eletromagnéticos (CE) na estimulação biossintética. Diversos experimentos indicam que o caminho da síntese de proteínas, quando se aplica o CE é similar às respostas observadas quando se aplica um estímulo térmico, e as células respondem devido ao “stress” produzido pelo efeito do estímulo aplicado. Outros resultados demonstram como as células, e especialmente os tecidos musculares, podem responder biossinteticamente às mudanças na estimulação elétrica. Estudos realizados num sistema modelo simples, mostraram que o transporte de Na e K-ATPase através das membranas, têm também aplicação útil, além de mostrar como pode acontecer a sinalização através das mesmas. O autor expôs células ao campo magnético e encontrou desvios no caminho de síntese de proteínas, que foi totalmente diferente, do ocorrido com as células controle. O mesmo foi observado para células submetidas a altas temperaturas (Choque térmico). Usando a mesma técnica, os autores encontraram que células expostas a estímulos térmicos (37°C, 20 min) manifestaram resposta similar àquelas observadas para células submetidas a estímulos magnéticos. O “stress” térmico tem sido bem caracterizado e sabe-se que um incremento da temperatura causa nas células uma indução na síntese de certas proteínas. Os resultados neste trabalho mostraram que o campo magnético (CM) é interpretado como um “stress”, que segue o mesmo mecanismo de resposta do incremento de temperatura. A resposta é geralmente chamada “stress” e tanto o CM como o calor ativam o mesmo. Ainda que existam semelhanças nas distribuições do peso molecular e ponto isoelétrico de proteínas de células submetidas à estimulação com CM e térmica, deve se enfatizar que a energia implicada é bem diferente. A energia do CM é muito menor que a energia térmica. As observações propõem que existem receptores com sensibilidades bem diferentes para cada modalidade, e a resposta de cada receptor é proporcional à energia. Em termos do ponto isoelétrico de proteínas, existe um desvio dos picos na distribuição de pH entre 5,8 e 6,3, e

no desenvolvimento de outros picos. Estas mudanças ocorrem nas proteínas devido à exposição aos campos magnéticos. Quando se compararam as células expostas com as controle encontraram-se diferenças mais pronunciadas no aumento do peso molecular a 30 kD, e uma diminuição a 70 kD.

CHACÓN et al. (1995) estudaram a influencia do campo eletromagnético no processo de produção de biomassa utilizando a levedura *Candida utilis* Y-660. Os resultados alcançados mostraram que o campo eletromagnético estimulou o crescimento celular em aproximadamente 20% e por conseguinte a produção de biomassa base seca. O modelo matemático obtido para a variável resposta, descreve um comportamento no linear do processo e a influência dos fatores estudados (indução magnética e tempo de tratamento magnético) no planejamento composto central, sendo a variável mais significativa o tempo de tratamento da suspensão celular e o efeito de interação de ambas variáveis.

VALBERG et al. (1997) fizeram uma análise para explicar os possíveis mecanismos de atuação de CM sobre organismos vivos e citam diversos exemplos que demonstram que os campos magnéticos e elétricos de 50/60 Hz, podem causar efeitos biológicos. Além disso enunciam que a nível molecular os CE e CM de 50/60 Hz aceleram os íons e proteínas carregadas eletricamente. Um dos exemplos dos bioefeitos encontrados, constitui a magnetofosfenes, a qual é estimulada quando a relação de cambio dB/dt (B: indução magnética) é aproximadamente de 800 mT/Seg (T: tesla). Ou seja, grandes variações do CM no tempo para baixas frequências podem produzir efeitos fisiológicos. O melhor exemplo experimental e maior suporte sólido do bioefeito produzido pelo uso de CM e CE de baixa frequência, constitui a eletorrecepção em peixes.

MEHEDINTU et al. (1997) estudaram a resposta da proliferação da levedura *S. cerevisiae* à aplicação de campos magnéticos alternados, numa região de amplitude de 0,2 a 12 mT produzido por um par de bobinas Helmholtz, Com uma variação de frequência entre 10 e 100 Hz e amplitude de 0,5 mT, os autores observaram que a 50 Hz e 0,5 mT, o rendimento na proliferação das leveduras aumentou em mais de $25 \pm 5 \%$, estimulando a produção de ATP das células. Foi encontrada uma dependência significativa da temperatura em função da indução magnética usada, porém sem diferencias significativas no consumo de glicose. Para resultados mais conclusivos, os autores sugeriram estudo num intervalo

mais amplo com os seguintes parâmetros: amplitude, frequência, tempo de tratamento e temperatura.

BINNINGER et al. (1997) estudaram os efeitos do campo magnético de baixa frequência (60 Hz AC) na expressão genética da levedura *S. cerevisiae*. Para isso, utilizaram exposições contínuas de 20 μ T de indução magnética durante um período de 15 gerações (aproximadamente 24 horas). O efeito foi avaliado pelas mudanças na quantidade de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro), que foi determinado por eletroforese em gel de dupla dimensão, aplicada aos produtos in vitro. Na maioria do RNAm examinado (44 a 67%), os efeitos nos níveis transcritos não foram diferentes daqueles observados nos experimentos expostos. Porém, a quantidade relativa de uma proporção significativa de RNAm (26 a 38%), foi aumentada em duas vezes nas células expostas ao campo magnético, e só uma pequena porcentagem de RNAm (7 a 18 %) mostrou níveis de decaimento inferiores aos das células controle (inferior a 50%).

LEI & BERG (1998) estudaram o efeito “janela eletromagnética” na velocidade de crescimento de *Corynebacterium glutamicum*. Para isto usaram bobinas Helmholtz e observaram que com frequência de 15 Hz e amplitude de 3,4 mT, aumentou-se o nível de formação de ATP em mais de 20% em 8 horas de exposição. Para uma frequência de 50 Hz e amplitude de 4,9 mT, o nível de ATP aumentou em mais de 30% depois de 6 horas de exposição contínua. Em ambos os casos, a concentração de ATP por célula permaneceu constante. Este resultado confirma os obtidos com *S. cerevisiae* estimulada com campos magnéticos análogos, embora no estudo realizado com leveduras a diferença tenha sido observada a partir de 2,5 horas.

Usando uma onda sinuoidal, MITTENZWEY et al. (1996) expuseram diferentes linhagens de bactérias a campos eletromagnéticos (CE) de baixa frequência, no intervalo de 2 a 50 Hz e amplitude de 1 a 10 mT. Variou-se a temperatura e o tempo de exposição, medindo-se o crescimento celular, a síntese de proteínas e a luminescência das bactérias. Os resultados obtidos discordam dos reportados por outros autores que encontraram fortes efeitos do CE, especialmente na cultura de células eucarióticas. Os autores reconhecem que as bactérias são totalmente resistentes aos CE, provavelmente devido a seus mecanismos de compensação e autoregulação. As diferenças nos resultados obtidos pelos diferentes

pesquisadores podem ser devidos aos planejamentos experimentais usados, linhagens, tempo de exposição, sistema usado para a geração do CE, métodos de detecção do campo eletromagnético, entre outros. Além disso, os resultados contraditórios e a falta de reprodutibilidade são problemas típicos nas pesquisas com CE, ainda que se possa fazer outros intentos para melhorar as condições de experimentação. Os resultados globais deste estudo indicam que os CE podem atuar nas bactérias como um fator co-estressante, que ativa o processo ou reação iniciado por outros fatores, como o aquecimento.

MENENDEZ et al. (1996) propuseram uma nova hipótese para explicação do mecanismo de traslocação do próton em mitocôndrias, bactérias e cloroplastos, baseada nas características do campo eletromagnético. Os autores certificam que a nova hipótese não contradiz o modelo quimiostático, que constitui a principal organização central dos processos de transferência de energia entre o transporte de elétrons e a sínteses de ATP em mitocôndrias, bactérias e cloroplastos. Depois de fazer diversas análises em diferentes sistemas de estudo, os autores chegaram à seguinte conclusão: se aceitarmos que os CE são gerados por transporte de elétrons associados ao sistema respiratório, seria lógico pensar que as interações entre as diferentes partes da membrana interna podem produzir o mesmo efeito durante a respiração ativa. Em suma, se em um motor elétrico a energia elétrica é transformada em energia mecânica, a transferência de elétrons associados ao sistema respiratório (energia elétrica) causa a traslocação do próton (energia mecânica) por meio do campo eletromagnético.

PICHKO et al. (1996) estudaram os efeitos do campo magnético de baixa frequência (50 Hz AC), na produção de diferentes metabólitos por diferentes microrganismos. Em seu estudo, usaram um gerador de campos magnéticos de indução linear, que funcionou a 50 Hz e indução magnética de 0,1 Tesla (1000 Gauss). Os autores encontraram efeitos positivos na produção de alguns dos compostos estudados, que oscilaram entre 10 e 20% nos experimentos realizados com a aplicação de campos eletromagnéticos, quando comparados com os controles. Para algumas linhagens encontrou-se também um aumento na biomassa seca final em relação aos controles. Aos 40 minutos de exposição ao campo eletromagnético, foram observados os melhores resultados para a biosíntese das enzimas em questão. Em tempos maiores que 60 minutos de exposição, a produtividade do processo começa a decrescer. Os autores concluíram que a

estimulação eletromagnética de indução linear nos processos de fermentação industriais estudados, deve-se à ativação dos sistemas enzimáticos, à aceleração do transporte de substâncias nutrientes, e a um efeito estimulatório no metabolismo celular.

IVANOVA et al. (1996) demonstraram a factibilidade do uso de um reator de leito fixo estabilizado magneticamente na produção contínua de etanol com células de *S. cerevisiae* imobilizadas. O processo de fermentação foi realizado aplicando-se um campo magnético externo transversal ao fluxo do fluido. O campo magnético aplicado produziu diferentes distribuições de partículas ao longo do reator, que afetaram a porosidade da cama, a área de contato efetiva fluido-partícula e os processos de transferência de massa na interface sólido-líquido. Como resultado das mudanças produzidas foi obtida maior concentração e produção de etanol, quando comparado aos processos convencionais que usam o reator de leito empacotado.

RAJA et al. (1997) estudaram a influência de campo magnético na cultura submersa de microrganismos, em colunas de bolha e Bioreatores AirLift. No estudo realizado, demonstraram que o campo magnético aumentou a velocidade específica de crescimento dos microrganismos, além de observar que a degradação dos licores fenólicos ocorre muito mais rápido em reatores "airlift" que em reatores de colunas de bolha. A aplicação do campo magnético no processo produziu uma degradação fenólica muito rápida, logrando-se o valor máximo para uma intensidade do campo de 220 Oe (Oe: Oestern). Os autores recomendaram estender estes métodos a outros processos de fermentação e produção de antibióticos.

ALAVERDYAN et al. (1996) estudaram a influência dos campos magnéticos constantes (CMC) e alternados na dinâmica do crescimento, e na capacidade de formação de ácidos de diferentes bactérias lácticas determinando que, o campo magnético alternado com frequência entre 1 e 10 Hz ativou a capacidade de formação de ácidos em *Lactobacterium acidophilum* e *L. helveticum*, depois de 30 minutos de exposição. Além disso, o CMC também aumentou a formação de ácidos, tendo o máximo efeito em *L. acidophilum* e *L. mazuni*, após exposição (1 a 2 horas). O leite foi tratado com CMC durante 30 minutos, observando-se um efeito positivo no crescimento de *L. acidophilum* em todas as fases de crescimento, sendo mais notável nas fases exponencial e estacionária.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo produtor de nisina

O microrganismo selecionado para a realização deste estudo foi o *L. lactis* ATCC 7962. A manutenção da cultura foi feita de acordo com o meio descrito na Tabela 1. O pH do meio foi ajustado para 7,0 antes da esterilização com NaOH (2N).

Tabela 1 - Composição do meio de manutenção de *L. lactis* (CCT 360) – meio nº1

Composto	Concentração (g/L)
Sacarose	10,0
Extrato de levedura	10,0
Peptona	10,0
KH ₂ PO ₄	10,0
NaCl	2,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,4

Após inoculação do microrganismo, a cultura foi incubada durante 24 horas a 37°C, sem agitação. O meio de cultura fermentado foi então distribuído em tubos de ensaio com glicerol 40%, e mantidos sob refrigeração a 4°C.

3.2 Microrganismo utilizado como teste para determinação da atividade de nisina

Para a determinação de atividade de nisina, empregou-se o *Streptococcus cremoris* (CCT 361). A manutenção da cultura foi feita no meio de cultura descrito na Tabela 2. O pH do meio foi ajustado para 7,0 antes da esterilização com NaOH (2N).

Tabela 2 - Composição do meio de manutenção de *S. cremoris* – meio nº2

Composto	Concentração (g/L)
Glicose	1,0
Extrato de levedura	1,0
Extrato de carne	1,0
Triptona	1,0
Na ₂ HPO ₄	0,2
NaCl	0,5

Após inoculação, a cultura foi incubada por 24 horas a 37°C, sem agitação. O meio de cultura fermentado foi então distribuído em tubos de ensaio com glicerol 40%, e mantidos sob refrigeração a 4°C.

3.3 Preparo do Inóculo

Uma alíquota da cultura de manutenção de *L. lactis* foi inoculada em frasco de Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura nº3, previamente esterilizado, sem a adição dos aminoácidos (Tabela 3). Os frascos foram incubados a 30°C durante 24 horas, sem agitação.

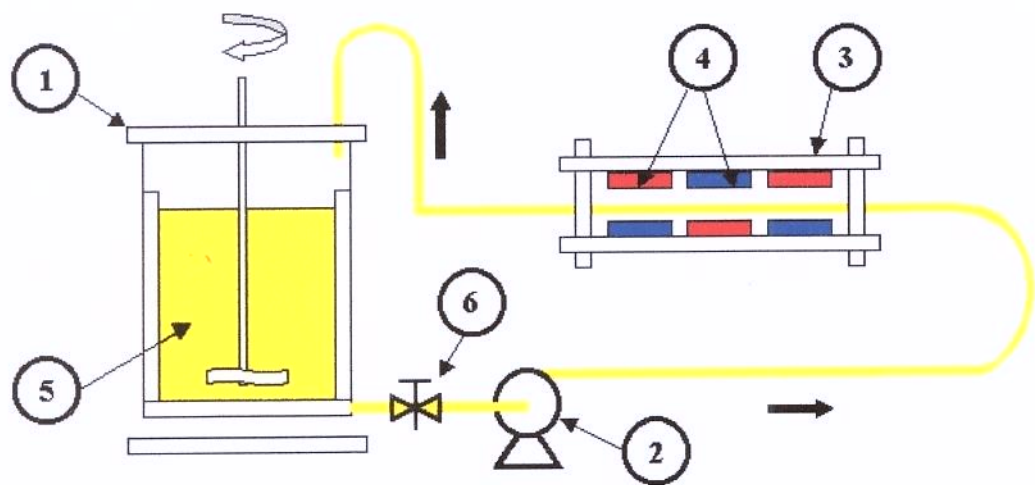
3.4 Fermentação para produção de nisina

A fermentação foi realizada em um fermentador “Bioflow-III”, com controle de temperatura e agitação, utilizando 4 litros de meio de cultura N°3 (Tabela 3). Após esterilização a 121 °C durante 15 minutos, foram inoculados 300 mL do inóculo obtido no item 3.3. O tempo de fermentação foi de 12 horas e a coleta das amostras foi feita a cada 4 horas. Foram controlados no processo os parâmetros: temperatura (30°C) e agitação (200 rpm).

Tabela 3 - Composição do meio de fermentação – meio nº3

Composto	Concentração (g/L)	Aminoácidos	Concentração (g/L)
Lactose	10,0	Alanina	1,3
KH ₂ PO ₄	5,0	Arginina	1,3
NaCl	1,0	Ácido glutâmico	1,3
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2	Histidina	1,3
		Valina	1,3
		Isoleucina	1,3
		Leucina	1,3
		Treonina	1,3
		Metionina	1,3

3.5 Tratamento magnético da suspensão celular



Legenda:1-bioreator, 2-bomba, 3-magnetizador de indução variável, 4-ímãs, 5-suspensão celular, 6-válvula de 3 vias.

Figura 1: Esquema do tratamento magnético da suspensão celular.

Para o tratamento magnético, a suspensão celular foi reciclada através de magnetizador de ímãs, conforme indicado na Figura 1. No magnetizador utilizado pode-se obter variações de indução magnética entre 50 e 200 Gauss (0,005-0,02 Tesla).

3.6 Planejamento Experimental

Para otimização do processo de obtenção de nisina, foi empregado um planejamento fatorial completo 2³ (dois níveis e três fatores) com ponto central, descrito na Tabela 5.

Tabela 4 – Níveis Experimentais utilizados no planejamento fatorial.

Níveis Codificados	Variáveis		
	B (Tesla)	t (h)	v (m/s)
-1	0,0050	4	0,85
0	0,0125	8	1,175
+1	0,0200	12	1,50

Tabela 5 – Valores codificados para cada variável no planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1
9	0	0	0

As variáveis estudadas foram:

B: Indução magnética (Tesla).

t: Tempo de duração do tratamento magnético (h).

v: Velocidade de reciclo da suspensão celular (m/s).

X₁: variável codificada para indução magnética.

X₂: variável codificada para tempo de tratamento magnético.

X₃: variável codificada para velocidade do reciclo da suspensão celular.

As respostas avaliadas no processo foram:

Y₁: Massa celular seca (g/L)

Y₂: Consumo de açúcares redutores totais (g/L)

Y₃: Rendimento biomassa/substrato (Y_{X/S}).

Y₄: Atividade de nisina (g/L).

Y₅: Rendimento produto/substrato (Y_{P/S}).

Y₆: Atividade específica de nisina (g de nisina/ g de massa celular seca)

3.7 Métodos Analíticos

Todas as amostras coletadas nas diferentes fermentações foram avaliadas quanto a atividade de nisina, consumo de açúcares redutores totais (ART), pH e massa celular seca.

3.7.1 Determinação da atividade de nisina

Para a determinação da atividade de nisina, nos diferentes ensaios de fermentação realizados, um tubo de ensaio contendo o microrganismo teste, *S. cremoris*, foi inoculado em 300 ml do meio de cultura nº1 (Tabela 1) previamente esterilizado a pH 7,0 e incubado a 37 °C por 10 minutos. Este meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio contendo 5 mL do mesmo meio previamente esterilizado na proporção 1:1. Uma alíquota de 1 mL do meio contendo nisina foi adicionado nestes tubos e os mesmos foram incubados a 37°C por 6 horas. A reação foi interrompida pela adição de 1ml de solução de tiomersalato 0,004% em cada tubo. A leitura das amostras desconhecidas foram comparadas com as da curva padrão (BERRIDGE e BARRET, 1952 modificado).

3.7.2 Curva padrão

Para construção da curva padrão usou-se o mesmo procedimento utilizado para determinação de atividade de nisina; porém, as amostras contendo nisina foram substituídas por 100 µg/mL de nisina comercial (Nisaplin), dissolvida em HCl 0,01N, da qual foram feitas sucessivas diluições. A primeira diluição da série padrão teve concentração de 10 µg de nisina/mL. Os valores de absorbância das diferentes diluições foram determinadas pela leitura em espectrofotômetro a 600 nm. Uma curva foi construída com os valores de log (µg/mL de nisina) versus absorbância a 600 nm. (BERRIDGE e BARRET, 1952 modificado).

3.7.3 Metodologia de análise de atividade de nisina

Na primeira etapa do trabalho padronizou-se o método de análise de atividade de nisina. Baseado na metodologia descrita por BERRIDGE e BARRET 1952. Foram feitas algumas modificações a fim de ajustar uma curva padrão que melhor se adaptasse ao microrganismo teste *S. cremoris* (CCT 361), e que a análise pudesse ser realizada em um tempo reduzido (6 horas).

A partir da Figura 2 pode-se verificar que o microrganismo teste atingiu uma fase de crescimento estacionário na 6^a hora de incubação. A partir desta informação adotou-se este como tempo ótimo para incubação do microrganismo na análise de atividade de nisina.

Para a construção da curva padrão, seguiu-se metodologia anteriormente citada e na Figura 11 do Apêndice mostra-se a curva representada, que foi empregada para a determinação da atividade de nisina de amostras desconhecidas.

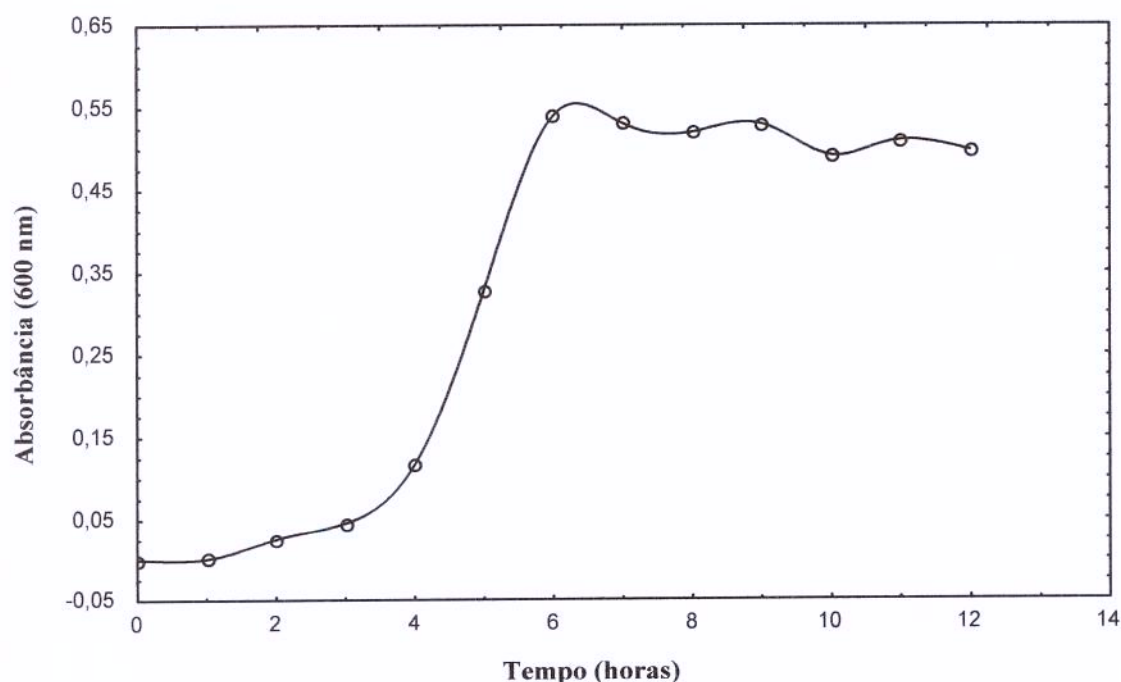


Figura 2 Curva de Crescimento do microrganismo *S. cremoris* (CCT 361).

3.7.4 Extração de nisina

Para a extração da nisina intracelular, adicionou-se HCl 4N na amostra até atingir a faixa de pH de 1,8 a 2,0. Em seguida, colocou-se a amostra em água em ebulição por 5 minutos, seguido de centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante contendo a concentração total de nisina (extra e intracelular) foi utilizado na análise de atividade neutralizando-se a amostra para evitar influência do pH.

3.7.5 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

A determinação de açúcares redutores totais (ART) foi feita pelo método de SOMOGYI-NELSON (1952) utilizando a curva padrão ilustrada na Figura 12 do Apêndice

3.7.6 Determinação de massa celular seca

As amostras foram centrifugadas e a massa de células decantada foi lavada por duas vezes com água destilada, seguindo-se de secagem em estufa à vácuo a 65 °C até peso constante.

3.7.7 Determinação de pH

A determinação do pH de cada amostra foi feita através de potenciômetro.

3.7.8 Determinação de Indução Magnética.

Para fixar os níveis de indução magnética no magnetizador (Figural), de acordo com os valores mostrados na Tabela 4, foi usado um teslametro MG-3D, modelo MG-3A, com possibilidade de medição de 0,001 a 10 Tesla.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Numa primeira etapa do trabalho foram realizados experimentos controles (sem tratamento magnético das células) com e sem reciclo celular (Figura 2), para determinar a existência de possíveis efeitos no processo devido à introdução do reciclo.

Foram realizados 4 experimentos e calculadas as médias das respostas obtidas, segundo mostra a Tabela 12 do Apêndice. Através dos resultados sugerimos que a introdução do reciclo pode ter causado um stress às células, já que houve uma diminuição na produção de nisina (atividade específica), que foi 3,3 vezes inferior quando comparado com o processo sem reciclo celular.

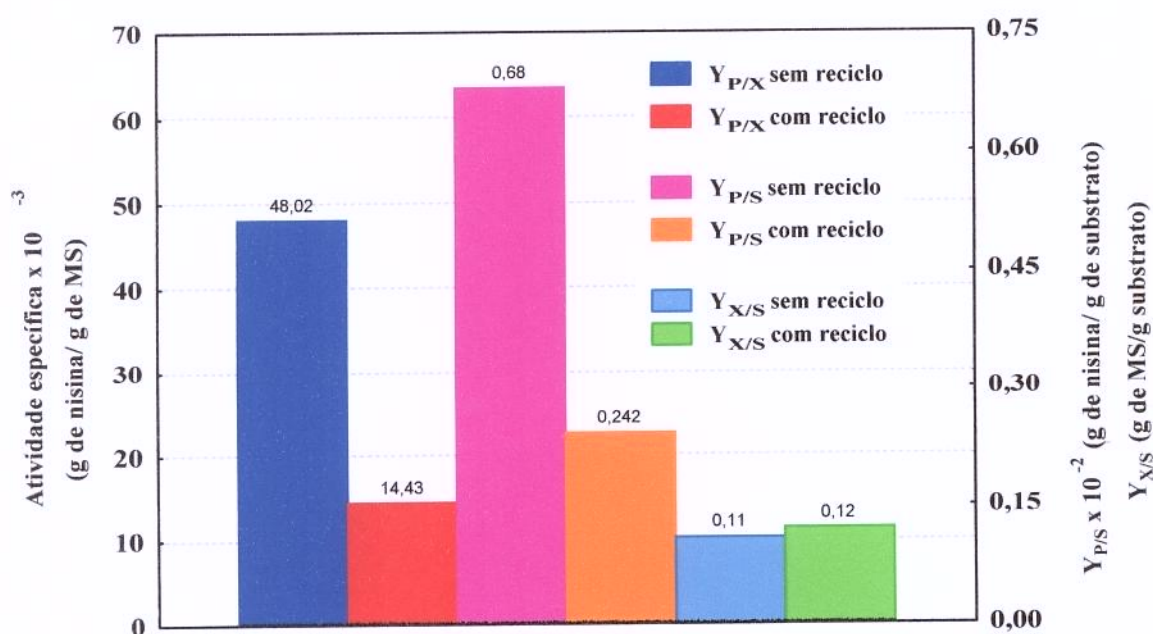


Figura - 2. Fermentações sem aplicação de campos magnéticos, com e sem reciclo celular: tempo de fermentação 24 h, velocidade do reciclo 0,85 m/s.

Posteriormente, foram realizadas 3 fermentações de 24 horas cada, utilizando uma velocidade de reciclo de 0,85 m/s. Após a análise dos resultados da Tabela 13 e 14, determinou-se que o tempo de fermentação para a realização deste trabalho seria de 12 horas. A Tabela 4 indica os níveis das variáveis e os valores reais estudados. A Figura 3 e Figura 4 ilustram o comportamento cinético dos ensaios realizados, onde pode-se observar que à partir de 12 horas de fermentação não houve grandes mudanças na produção de biomassa, no pH e no consumo de açúcares redutores totais, bem como na produção de nisina.

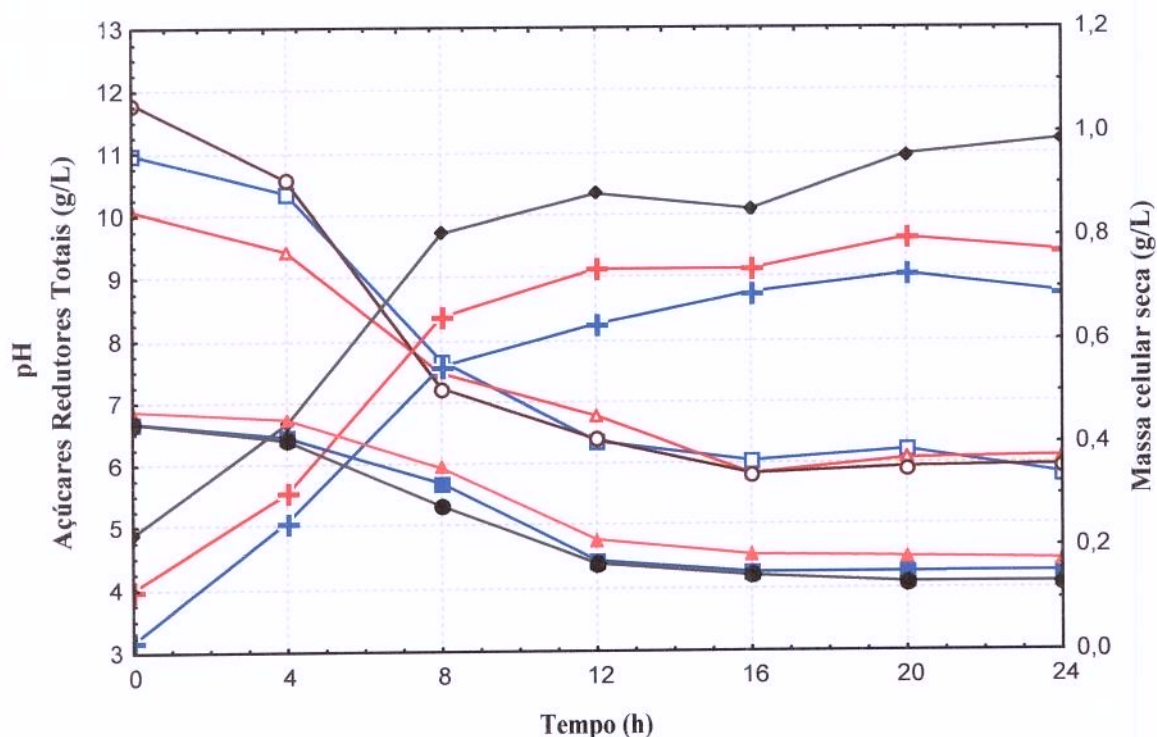


Figura - 3. Cinética da produção de nisina para diferentes condições experimentais:

■, Experimento A ($B = 0.02T$, $t = 24h$, $v = 0.85m/s$); ■, Experimento B ($B = 0.005T$, $t = 24h$, $v = 0.85m/s$); ■, Experimento C ($B = 0.00T$, $t = 24h$, $v = 0.85m/s$); □, ART (Exp. A); △, ART (Exp. B); ○, ART (Exp. C); +, MCS (Exp. A); +, MCS (Exp. B); ◆, MCS (Exp. C); ■, pH (Exp. A); ▲, pH (Exp. B); ●, pH (Exp. C)

Na segunda etapa do trabalho, foram realizados os ensaios correspondentes ao planejamento fatorial descrito na Tabela 5. O objetivo fundamental, consistiu em avaliar os efeitos do campo magnético no processo de produção, para que sejam comparadas as respostas obtidas nos experimentos do planejamento (Tabela 15 à Tabela 24 do Apêndice), com as médias das respostas dos experimentos controles. Os valores do experimento controle mostrados nas Figuras 5 a 10, referem-se ao valor médio de 3 ensaios realizados (ver Tabela 31 no Apêndice).

Posteriormente, foi feita uma análise para cada figura representando os resultados obtidos nas variáveis respostas, assim como o efeito que os fatores estudados tiveram sobre as mesmas.

Fazendo uma análise dos resultados obtidos na Figura 5 percebe-se que, tempos de tratamento de 12 horas e velocidade de reciclo de 1,5 m/s estimularam a produção de biomassa em 1,66 vezes, em relação ao experimento controle. Por outro lado, a indução magnética de

0,005 Tesla, o tempo de tratamento de 4 horas e velocidade de reciclo de 0,85 m/s inibiram o crescimento celular em 7,6%.

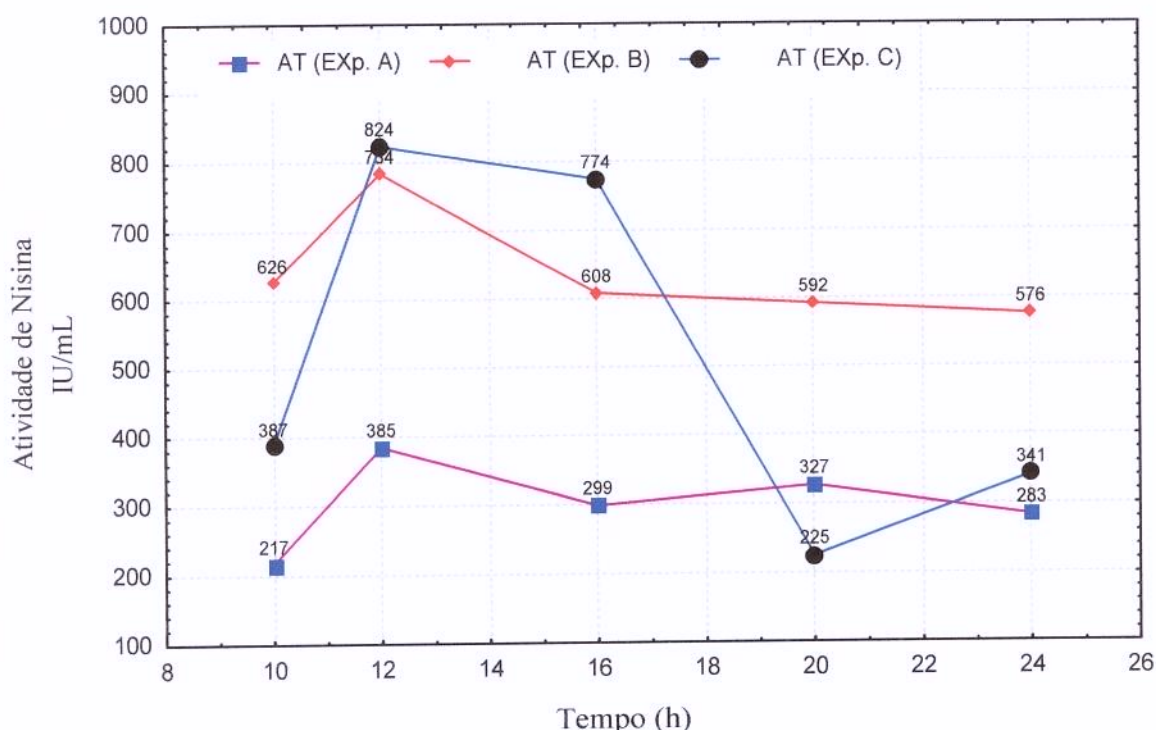


Figura - 4. Produção de nisina em diferentes condições experimentais:

■, Experimento A ($B = 0.02T$, $t = 24h$, $v = 0.85m/s$); ♦, Experimento B ($B = 0.005T$, $t = 24h$, $v = 0.85m/s$); ●, Experimento C ($B = 0.00T$, $t = 24h$, $v = 0.85m/s$).

A Figura 6 mostra o consumo de substrato (lactose) medida em termos de ART (açúcares redutores totais), destacando que induções magnéticas entre 0,005 e 0,0125 Tesla, e tempos de tratamento entre 4 e 8 horas, causaram maior consumo de açúcares redutores totais quando comparados com o controle. O efeito contrário obteve-se quando usou-se o tempo de tratamento de 12 horas, consumindo entre 8% e 12% menos substrato.

Pelos rendimentos $Y_{X/S}$ mostrados na Figura 7, observa-se que os melhores resultados foram obtidos principalmente para tempos de tratamento de 12 horas, sendo superiores entre 1,63 e 1,79 vezes, em relação ao controle. A inibição mais representativa obteve-se quando foi usada a indução magnética de 0,005 Tesla, o tempo de tratamento de 4 horas e a velocidade do reciclo de 0,85 m/s, com 31% de diminuição em relação ao controle. Estes resultados demonstram que o tempo de tratamento magnético é a variável de maior influencia no processo, quando comparada com a indução magnética e a velocidade de reciclo do fluido, ou

seja, as mudanças no tempo de tratamento produzem maior variação nas respostas obtidas no rendimento $Y_{X/S}$.

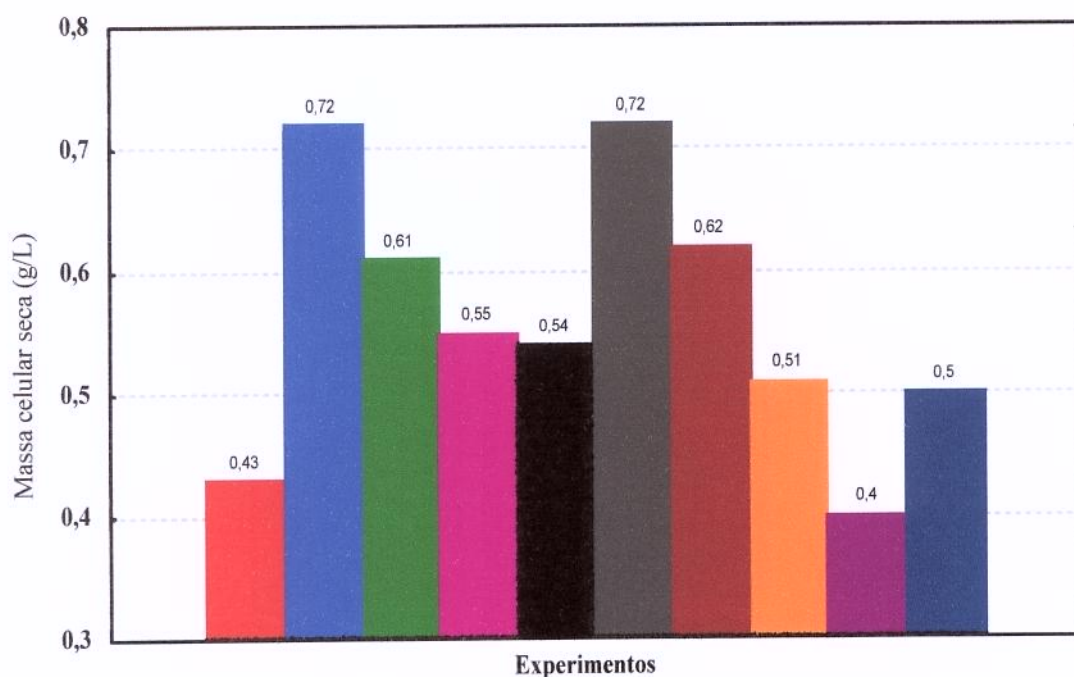


Figura - 5. Produção de massa celular para diferentes condições experimentais: ■, Controle; ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 1.5 m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.0125T, t= 8h, v= 1.175m/s).

Os resultados mostrados na Figura 8 indicam que, tempos de tratamento de 4 horas e velocidade de reciclo de 1,5 m/s constituem as condições ótimas para o aumento da produção de nisina, sendo de 3,24 a 4,41 vezes superiores, em relação ao processo convencional. O contrário acontece para tempos de tratamento de 12 horas e velocidade de reciclo de 1,5 m/s, com produções inferiores entre 42% e 54%. Pode-se concluir que, a produção de nisina não está associada diretamente à produção de biomassa conforme foi descrito por DE VUYST e VANDAMME (1992). Os resultados obtidos demonstram que as condições experimentais que melhoram o rendimento $Y_{X/S}$, não constituem as mesmas que favorecem o aumento da produção de nisina. Os resultados mais significativos são representados pelo tempo de tratamento de 4 horas e velocidade de 1,5 m/s, ou seja, a indução magnética não constitui uma variável significativa no intervalo objeto de estudo (0,005 - 0,02Tesla).

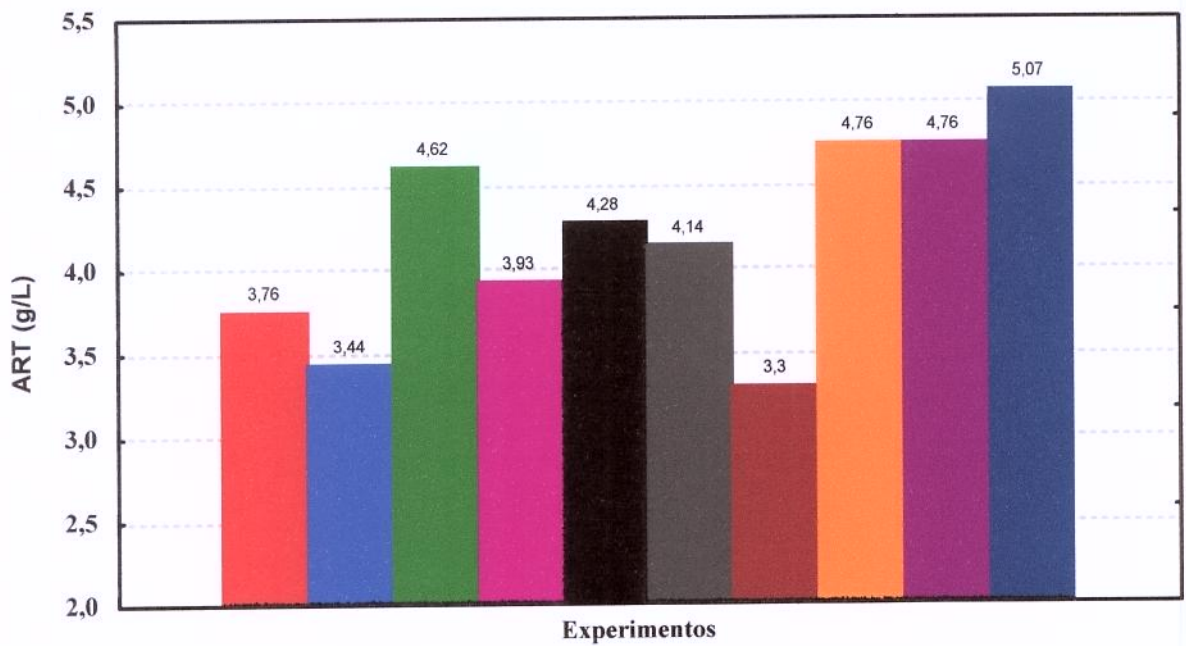


Figura - 6. Consumo de açúcares redutores totais nos diferentes experimentos: ■, Controle; ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 1.5 m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 0.85m/s) ; ■, (B= 0.0125T, t= 8h, v= 1.175m/s).

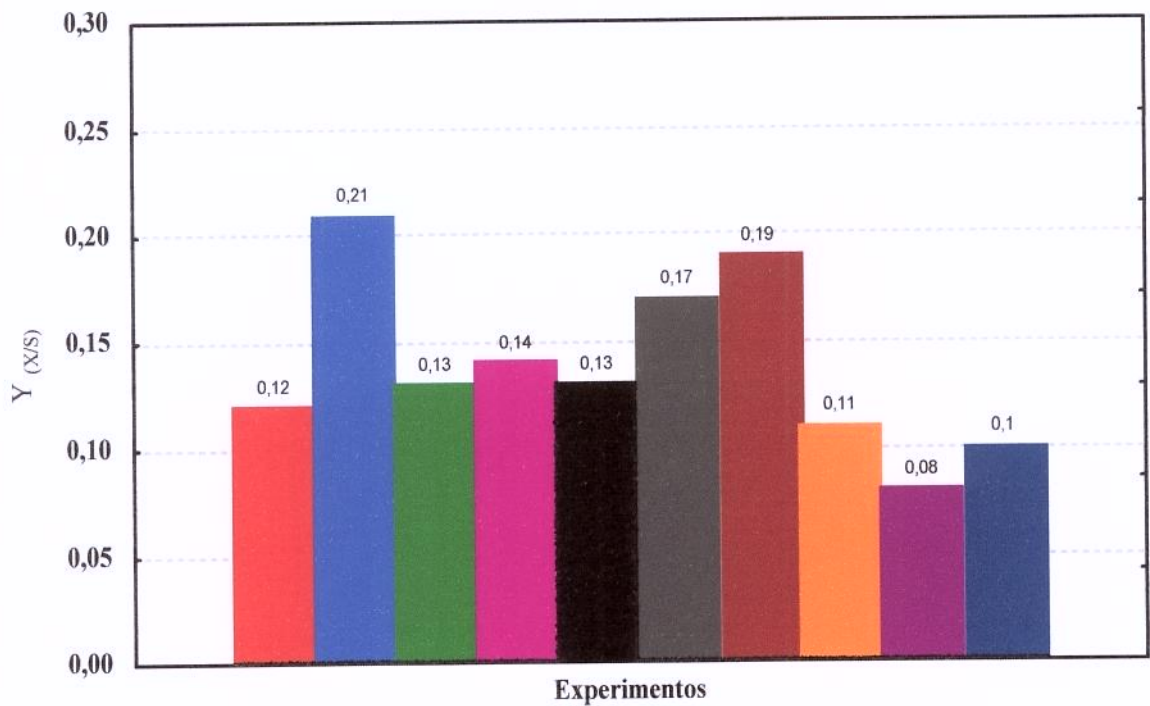


Figura - 7. Rendimento $Y_{X/S}$ (Biomassa/substrato) por experimentos: ■, Controle; ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 1.5 m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 0.85m/s) ; ■, (B= 0.0125T, t= 8h, v= 1.175m/s).

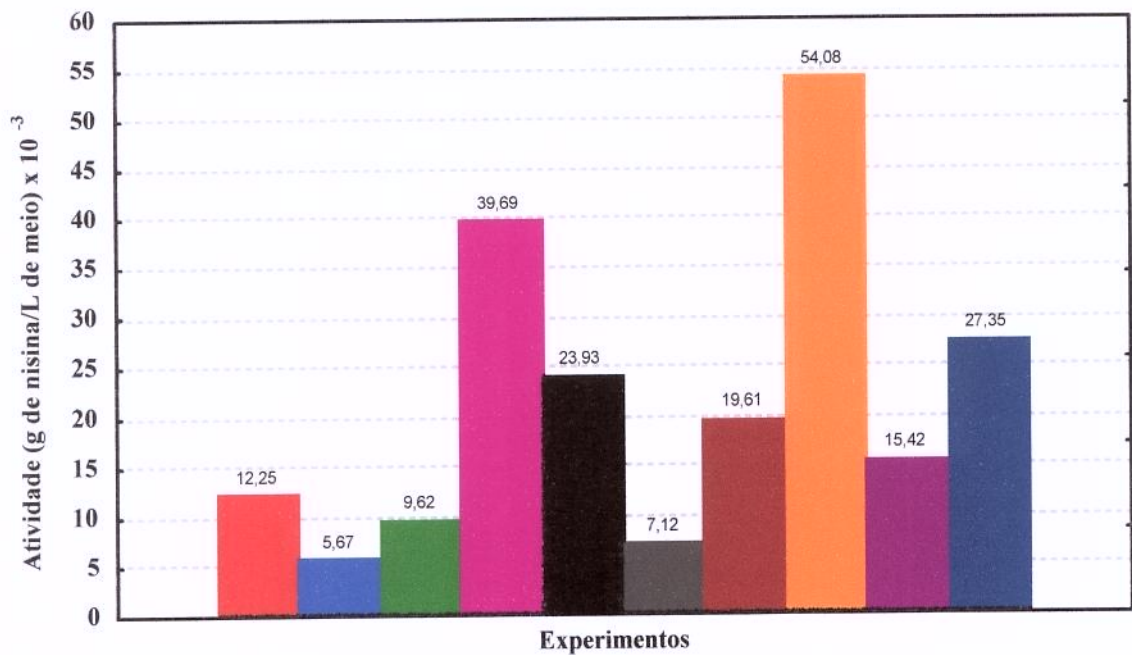


Figura - 8. Produção de nisina para diferentes condições experimentais: ■, Controle; ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 1.5 m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 0.85m/s) ; ■, (B= 0.0125T, t= 8h, v= 1.175m/s).

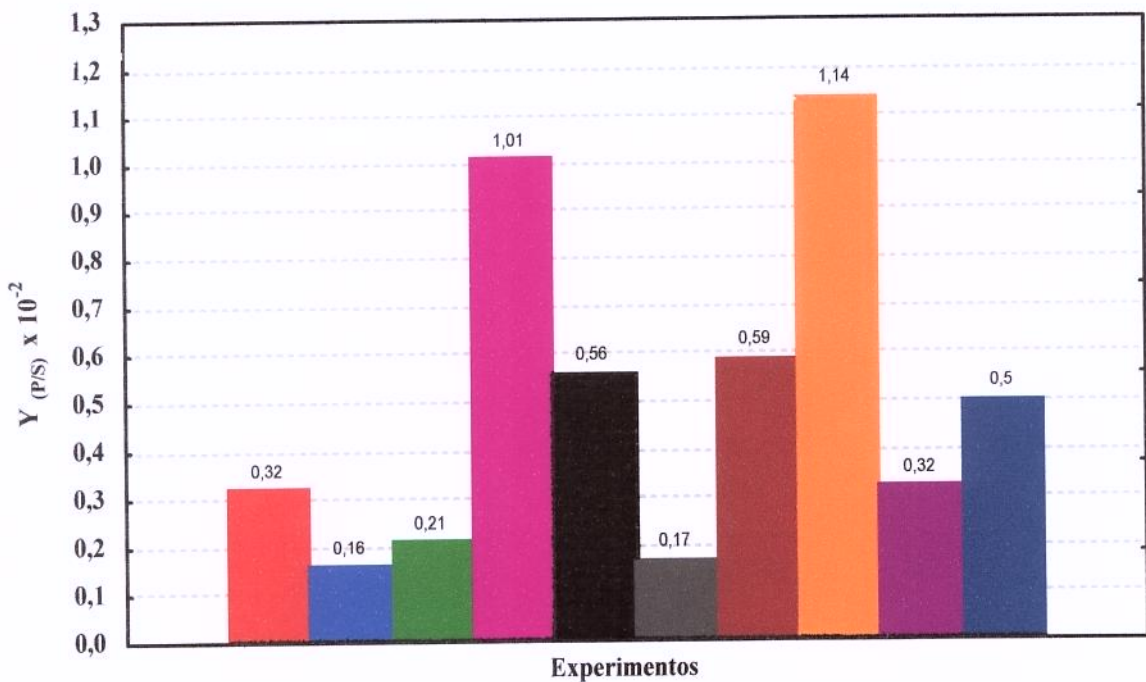


Figura - 9. Rendimento $Y_{p/S}$ (g nisina/g substrato) por experimentos: ■, Controle; ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 1.5 m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 0.85m/s) ; ■, (B= 0.0125T, t= 8h, v= 1.175m/s).

Como esperado a análise do rendimento $Y_{P/S}$ na Figura 9 apresentou a mesma resposta que na análise anterior. O tempo de tratamento de 4 horas e velocidade de reciclo de 1,5 m/s, representam um incremento no rendimento entre 3,16 e 3,56 vezes. O efeito inverso aconteceu para tempos de tratamento de 12 horas e velocidade de reciclo de 1,5m/s, com rendimentos inferiores entre 47% e 50%, em relação ao controle. Novamente, fica em evidência que a variável mais significativa é o tempo de tratamento magnético, seguido da velocidade de reciclo da suspensão celular.

Na Figura 10, os resultados obtidos de atividade específica, confirmam que os valores alcançados, mesmo sendo inferiores aos reportados por MATSUSAKI et al. (1996), encontram-se na faixa dos valores obtidos por FLÔRES (2000) para as 12 horas de fermentação. Além disso, é importante destacar que a linhagem de *L. lactis*, utilizada neste estudo apresentou rendimentos inferiores nos experimentos controles quando comparados com os resultados publicados por FLÔRES (2000), não sendo as reduções de atividade causadas pela aplicação do campo magnético no processo.

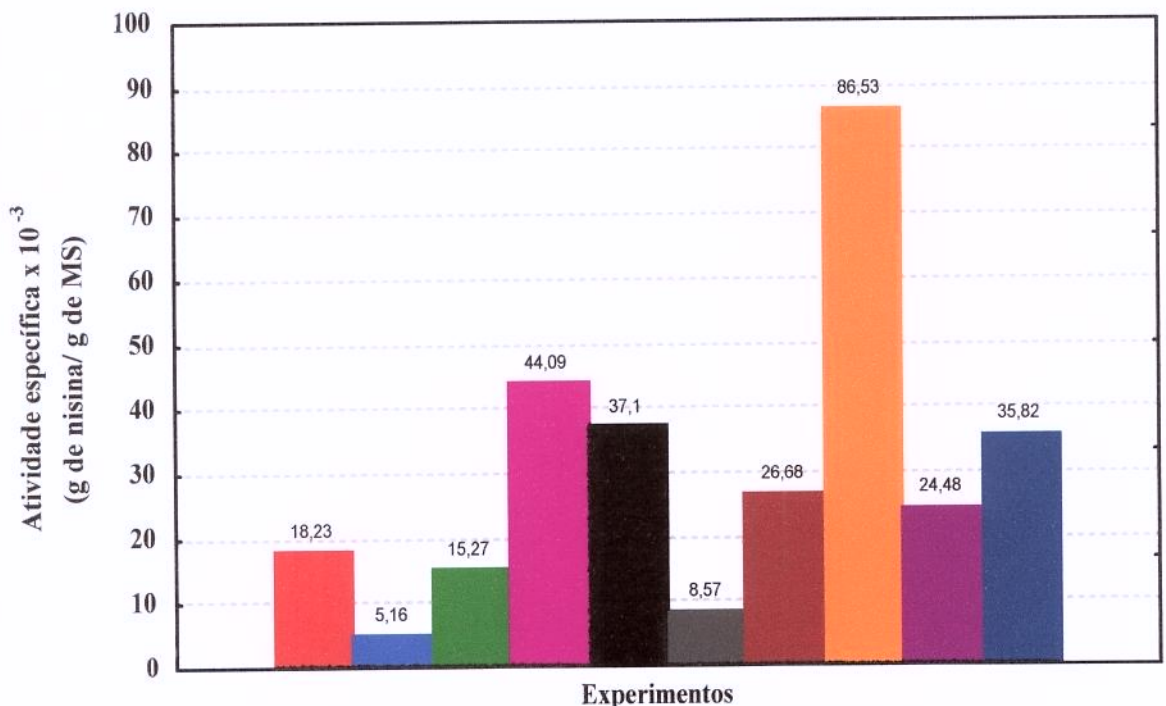


Figura - 10. Atividade específica (g de nisina/g de MS) por experimentos: ■, Controle; ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.02T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 1.5 m/s); ■, (B= 0.02T, t= 4h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 12h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 1.5m/s); ■, (B= 0.005T, t= 4h, v= 0.85m/s); ■, (B= 0.0125T, t= 8h, v= 1.175m/s).

Confirma-se que, para o tempo de tratamento de 4 horas e velocidade de reciclo de 1,5 m/s, ocorreu aumento nos níveis de atividade específica entre 2,42 e 4,75 vezes, quando comparadas com o controle. Tempos de tratamento de 12 horas e velocidade de reciclo de 1,5 m/s inibiram a produção de nisina entre 53% e 72%, o que evidencia mais uma vez, que a aplicação do campo magnético exerce influência nos processos biológicos, tendo efeito positivo no intervalo estudado (MEHEDINTU et al., 1997), sendo a variável mais significativa, o tempo de tratamento magnético, quando comparado com o efeito exercido pela velocidade de reciclo do fluido e a indução magnética.

Como última fase do trabalho, os resultados obtidos foram processados estatisticamente conforme o planejamento fatorial completo com ponto central (Tabela 15), para assim determinar caso a caso a influência dos fatores indução magnética, tempo de tratamento magnético e velocidade do reciclo celular nos modelos matemáticos que descrevem o comportamento das respostas durante o processo de produção de nisina por *L. lactis*, com aplicação de campos magnéticos.

Da Tabela 25 a Tabela 30 do Apêndice, podem ser observados os valores dos efeitos principais e seus erros padrões para cada resposta analisada. O processamento dos resultados experimentais foi feito através do programa estatístico STATISTICA 5.0 para o nível de confiança de 95%. Para comprovar a significância estatística da regressão foi empregado o teste F, assim como, para determinar a evidência de falta de ajuste ou não, dos modelos obtidos.

SQ_R : soma quadrática devida à regressão.

SQ_r : soma quadrática residual.

SQ_{Faj} : soma quadrática devida à falta de ajuste.

SQ_{ep} : soma quadrática devida ao erro puro.

SQ_T : soma quadrática total.

MQ_R : média quadrática devida à regressão.

MQ_r : média quadrática residual.

MQ_{Faj} : média quadrática devida à falta de ajuste.

MQ_{ep} : média quadrática devida ao erro puro.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r$$
$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{Faj}$$

Porcentagem de variação explicada = SQ_R/SQ_T

Porcentagem máxima de variação explicável = $(SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$

$$F_{calculado} = MQ_R/MQ_r \quad (\text{Regressão})$$
$$F_{calculado} = MQ_{Faj}/MQ_{ep} \quad (\text{Falta de ajuste})$$

Devido a ausência de réplicas experimentais no planejamento fatorial (Tabela 15), para determinar a evidência de falta de ajuste nos modelos, foi estimada a média quadrática devida ao erro puro, utilizando a variância das respostas obtidas nos experimentos controles mostrados na Tabela 31.

Os modelos matemáticos lineares codificados e reais obtidos para cada variável resposta analisada seguem o modelo:

$Y_i = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3$

Onde: Y_i representa a variável dependente analisada (resposta), b_i os parâmetros do modelo (efeitos) e X_i os fatores codificados.

Os modelos obtidos foram:

Y_1 : Produção de massa celular seca (g/L)

$Y_1 = 0,572 + 0,044 \cdot X_1 + 0,169 \cdot X_2 + 0,081 \cdot X_3$

$MS = - 0,132 + 5,833 \cdot B + 0,042 \cdot t + 0,25 \cdot v$

Tabela 6. Análise de variância para o modelo linear obtido para a produção de massa celular.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	
				F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	0,073984	3	0,024661	8,81	5,41
Resíduos (r)	0,013994	5	0,002799		
Falta de ajuste (FA)	0,013794	3	0,004598	45,98	19,16
Erro puro (EP)	0,000200	2	0,0001		
Total (T)	0,087978	8			

Porcentagem de variação explicada = 84,09

Porcentagem máxima de variação explicável = 99,77

Nos resultados de análise de variância para a produção de massa celular seca (Y_1) mostrados na Tabela 6, verificamos que $F_{calculado}$ é maior que o valor de $F_{tabelado}$ ($8,81 > 5,41$),

indicando a existência de uma regressão significativa no modelo do ponto de vista do teste F. Porém, sugere-se utilizar o modelo para fins preditivos só quando o valor de $F_{\text{calculado}}$ é no mínimo de 4 a 5 vezes o valor de F_{tabelado} (BOX e WETZ, 1973) condição que não foi satisfeita em nosso modelo. Além disso, também mostrou uma falta de ajuste significativa sendo o $F_{\text{calculado}}$ maior que o valor de F_{tabelado} ($45,98 > 19,16$), indicando que mudanças nos níveis dos fatores estudados não representam mudanças significativas nas respostas obtidas a partir do modelo linear.

Os modelos obtidos para as demais respostas estudadas não mostraram falta de ajuste, sendo os valores de $F_{\text{calculado}}$ sempre menores que os de F_{tabelado} . Isto confirma a evidência estatística suficiente para acreditar que não existe uma relação linear entre os fatores estudados e as respostas dos diferentes modelos, ou seja, os valores de $F_{\text{calculado}}$ sempre foram maiores que os de F_{tabelado} para a regressão.

Y_2 : Consumo de açúcares redutores totais (g/L)

$$Y_2 = 4,255 - 0,173 \cdot X_1 - 0,556 \cdot X_2 - 0,174 \cdot X_3$$

$$ART = 6,286 - 23,1 \cdot B - 0,139 \cdot t - 0,536 \cdot v$$

Tabela 7. Análise de variância para o modelo linear obtido para o consumo de ART.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	
				$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão (R)	0,739585	3	0,246528	0,54	5,41
Resíduos (r)	2,273651	5	0,454730		
Falta de ajuste (FA)	1,799451	3	0,599817	2,53	19,16
Erro puro (EP)	0,4742	2	0,237100		
Total (T)	3,013236	8			

Porcentagem de variação explicada = 24,54

Porcentagem máxima de variação explicável = 84,26

Y_3 : Rendimento biomassa/substrato (g massa celular seca/ g de substrato).

$$Y_3 = 0,140 + 0,015 \cdot X_1 + 0,060 \cdot X_2 + 0,025 \cdot X_3$$

$$Y_{X/S} = -0,095 + 2 \cdot B + 0,015 \cdot t + 0,077 \cdot v$$

Tabela 8. Análise de variância para o modelo linear obtido para o rendimento $Y_{X/S}$.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	
				F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	0,0089	3	0,002967	2,60	5,41
Resíduos (r)	0,0057	5	0,001140		
Falta de ajuste (FA)	0,0051	3	0,0017	5,67	19,16
Erro puro (EP)	0,0006	2	0,0003		
Total (T)	0,0146	8			

Porcentagem de variação explicada = 60,96

Porcentagem máxima de variação explicável = 95,89

Y_4 : Atividade de nisina (g de nisina/litro de meio).

$$Y_4 = 0,023 - 0,004 \cdot X_1 - 0,023 \cdot X_2 + 0,009 \cdot X_3$$

$$AT = 0,041 - 0,577 \cdot B - 0,006 \cdot t + 0,029 \cdot v$$

Tabela 9. Análise de variância para o modelo linear obtido para a atividade de nisina.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	
				F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	0,001255	3	0,000418	2,59	5,41
Resíduos (r)	0,000807	5	0,000161		
Falta de ajuste (FA)	0,000753	3	0,000251	9,30	19,16
Erro puro (EP)	0,000054	2	0,000027		
Total (T)	0,002062	8			

Porcentagem de variação explicada = 60,86

Porcentagem máxima de variação explicável = 97,38

Y_5 : Rendimento produto/substrato (g de nisina/g de substrato).

$$Y_5 = 0,005 - 0,001 \cdot X_1 - 0,005 \cdot X_2 + 0,002 \cdot X_3$$

$$Y_{P/S} = 0,009 - 0,093 \cdot B - 0,001 \cdot t + 0,006 \cdot v$$

Tabela 10. Análise de variância para o modelo linear obtido para o rendimento $Y_{P/S}$.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	
				F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	0,000054	3	0,000018	1,88	5,41
Resíduos (r)	0,000048	5	0,000010		
Falta de ajuste (FA)	0,000046	3	0,000015	15,19	19,16
Erro puro (EP)	0,000002	2	0,000001		
Total (T)	0,000102	8			

Porcentagem de variação explicada = 52,94

Porcentagem máxima de variação explicável = 98,04

Y₆: Atividade específica de nisina (g de nisina/ g de massa celular seca)

$Y_6 = 0,032 - 0,011 \cdot X_1 - 0,034 \cdot X_2 + 0,010 \cdot X_3$

$AT_{esp} = 0,081 - 1,488 \cdot B - 0,009 \cdot t + 0,031 \cdot v$

Tabela 11. Análise de variância para o modelo linear obtido para a atividade específica.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	
				F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	0,002787	3	0,000929	2,32	5,41
Resíduos (r)	0,002005	5	0,000401		
Falta de ajuste (FA)	0,001921	3	0,000640	15,42	19,16
Erro puro (EP)	0,000084	2	0,000042		
Total (T)	0,004792	8			

Porcentagem de variação explicada = 58,16

Porcentagem máxima de variação explicável = 98,25

Uma vez evidenciado que os modelos lineares não servem para descrever o efeito da aplicação do campo magnético no processo (CHACÓN et al., 1995), indicamos que se utilize o modelo quadrático, coisa que não é possível obter com o planejamento completo 2³ com ponto central. O novo modelo deve ser composto por 11 parâmetros, sendo que testamos apenas 9 níveis no planejamento, sendo impossível determinar as estimativas quando há mais parâmetros do que níveis. Isto pode ser solucionado ampliando o planejamento, que pode ser feito de várias maneiras. A mais comum é a construção de um planejamento em estrela que consistiria em acrescentar ao planejamento já existente um planejamento idêntico, porém girado de 45 graus em relação à orientação de partida (BARROS et al., 1996).

5. CONCLUSÕES

1- A introdução do reciclo celular no processo de produção de nisina por *L. lactis*, utilizando velocidade de reciclo de 1,5 m/s, causou diminuição na produção de nisina (atividade específica), sendo 3,3 vezes inferior quando comparado com o processo sem reciclo celular.

2- O estudo cinético do processo confirmou que a nisina é um metabólito primário produzido na fase de crescimento exponencial, obtendo os maiores rendimentos no tempo de 12 horas de fermentação.

3- A aplicação do campo magnético no processo estimulou a produção de biomassa em 1,66 vezes, para tempos de tratamento de 12 horas e velocidade de reciclo de 1,5 m/s.

4- A produção de nisina não está associada diretamente à produção de biomassa como foi descrito por DE VUYST e VANDAMME (1992). As condições que influenciaram o aumento do rendimento $Y_{X/S}$, não constituem as mesmas que favoreceram o aumento da produção de nisina.

5- A aplicação do campo magnético exerceu influência no processo, tendo efeito positivo no intervalo estudado, possibilitando aumento na produção de nisina entre 2,42 e 2,75 vezes.

6- A indução magnética não constituiu uma variável significativa no intervalo estudado (0,005 a 0,02 Tesla). Os melhores resultados foram obtidos com o tempo de tratamento de 4 horas e a velocidade de 1,5 m/s.

7- Os modelos lineares determinados para as respostas estudadas não descrevem o comportamento do processo.

6. RECOMENDAÇÕES

- 1- Repetir os experimentos que obtiveram os melhores resultados quanto a produção de nisina.
- 2- Estudar uma faixa de campos magnéticos mais ampla, para determinar os efeitos da variável indução magnética e suas interações no processo (0,02 - 0,1 Tesla).
- 3- Fazer um novo planejamento fatorial em estrela que permita ajustar as respostas a modelos quadráticos.
- 4- Estudar a relação da produção de ácido láctico e nisina durante o curso da fermentação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. ALAVERDYAN, Z. R.; AKOPYAN, L. G.; CHARYAN, L. M. & AIRAPETYAN, S. N. Impact of magnetic fields on growth dynamics and acid formation in lactic acid bacteria. Microbiology, Moscu. 65(2): 213-216, MAR-APR, 1996.
- [2]. AMIALI, M. N., LACROIX, C. & SIMARD, R. E. High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL 719 in whey permeate with aeration. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 14: 887-894, 1998.
- [3]. BARROS, B., SCARMINIO, I. S., & BRUNS, R. E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp, 2. Ed., 299 p., Campinas, 1996.
- [4]. BEHEDINTU, M. & BERG, H. Proliferation response of yeast *S. cerevisiae* on electromagnetic field parameters. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Lausanne. 43(1): 67-90, 1997.
- [5]. BERRIDGE, N. J. & BARRET, J. A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics. Journal General of Microbiology, Tokyo. 6, 14-20, 1952.
- [6]. BINNIGER, D. & UNGVICHIAN, V. Effects of 60 Hz AC magnetic fields on gene expression following exposure over multiple cell generations using *S. cerevisiae*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Lausanne. 43: 83-89, 1997.
- [7]. BLANK, M. Biological effects of electromagnetic fields. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Lausanne. 32: 203-210, 1993.
- [8]. BOX, G. E. P. & WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. Technical Report, University of Wisconsin. 9, 1973.
- [9]. CASERIO, G; CIAMPELLA, A.; GEMARY, M. & BARLUZZY, A. M. Riserche siell utilizzazione della nisina in prodotti cotti di salumificio. Industrie Alimentari, Pinerolo. gennaio: 1-12, 1979.

- [10]. CHACÓN, A. D.; HABER, P. V.; FONG, R. A.; MÁS, D. S.; SERGUERA, N. M. & RODRÍGUEZ, J. O. Influencia del campo electromagnético en el crecimiento de la levadura *Candida utilis* y-660. **Revista Tecnología Química**, Habana. Vol. 15, 3: 52-60, 1995.
- [11]. CHINACHOTI, N., ENDO, N., SONOMOTO, K. & ISHIZAKI, A. Bioreactor system for efficient production and separation of Nisin Z using *Lactococcus lactis* IO-1. **Journal Fac. Kyushi University**, 43 (3-4): 421-436, 1997a.
- [12]. CHINACHOTI, N., ZAIMA, T. MATSUSAKI, H. SONOMOTO, K. & ISHIZAKI, A. Relationship between Nisin Z fermentative production and aeration condition using *Lactococcus lactis* IO-1. **Journal Fac. Kyushi University**, 43 (3-4): 437-448, 1997b.
- [13]. CHINACHOTI, N., ZAIMA, T. MATSUSAKI, H. SONOMOTO, K. & ISHIZAKI, A. Nisin Z production by *Lactococcus lactis* IO-1 using xilose as a carbon source. **Bioscience and Biotechnology ang Biochemical**, 62 (5): 1022-1024, 1998.
- [14]. DE VUYST, L. & VANDAMME, E. J. Influence of the carbon source on nisin production in *L. lactis* subsp *lactis* batch fermentation. **Journal of General Microbiology**, Tokyo. 138: 571-578, 1992.
- [15]. DE VUYST, L. & VANDAMME, E. J. Influence of the phosphorous and nitrogen source on nisin production in *L. lactis* subsp *lactis* batch fermentations using a complex medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin. 40: 17-22, 1993.
- [16]. DE VUYST, L. Nisin production variability between natural *L. lactis* subsp *lactis* strain. **Biotechnology Letters**, London. 16: 287-292, 1994.
- [17]. DE VUYST, L. Nutritional factors affecting nisin production by *L. lactis* subsp *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington. 78: 28-33, 1995.
- [18]. DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technology**, Chicago. November 100-112, 117, 1990.

- [19]. DELVES-BROUGHTON, J.; WILLIAMS, G. C. & WILKINSON, S. The use of the bacteriocin, Nisin, as a preservative in pasteurised liquid whole egg. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford. 15: 133-136, 1992.
- [20]. DELVES-BROUGHTON, J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R. J. & HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht. 69: 193-202, 1996.
- [21]. FLÔRES, S. Estudo do bioconservante nisina por *Lactococcus lactis subsp lactis*. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2000.
- [22]. GOULHEN, F., MEGHROUS, J. & LACROIX, C. Production of a nisin Z/Pediocin mixture by pH-controlled mixed-strain batch cultures in supplemented whey permeate. **Journal of Applied Microbiology**, 86: 399-406, 1999.
- [23]. HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P. & KLAENHAMMER, T. R. Characterization of two nisin-producing *L. lactis* subsp *lactis* strain isolated from a commercial sauerkraut fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. 58, 5: 1477-1483, 1992.
- [24]. HENNING, S. METZ, R. & HAMMES, W. P. New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action. **International Journal of Food Microbiology**, 3: 121-134, 1986b.
- [25]. HIRSH, A. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. **Journal of General Microbiology**, Tokyo. 5: 208-221, 1951.
- [26]. HURST, A. Biosynthesis of the antibiotic nisin and other basic peptides by *Streptococcus lactis* growth in batch culture. **Journal of General Microbiology**, Tokyo. 45: 503-513, 1966.
- [27]. HURST, A. & DRING, G. J. The relation of the length of lag phase of growth to the synthesis of nisin and other basic proteins by *Streptococcus lactis* growth under different cultural conditions. **Journal of General Microbiology**, 50: 383-390, 1968.

- [28]. HURST, A. Nisin. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego. **27**: 85-123, 1981.
- [29]. IVANOVA, V.; HRISTOV, J. & DOBREVA, E. Performance of a magnetically stabilized bed reactor with immobilized yeast cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Tokyo. **59**: 187-198, 1996.
- [30]. KERNS, G.; BAUER, E. & BERG, H. Electrostimulation of cellulase fermentation by pulsatile electromagnetically induced currents. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, Lausanne. **32**: 89-94, 1993.
- [31]. LEI, Ch. & BERG H. Electromagnetic window effects on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, Lausanne. **45**: 261-265, 1998.
- [32]. LIU, W. & HANSEN J. N. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *L. lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. **56**, **8**: 2551-2558, 1990.
- [33]. MATSUSAKI, H., CHINACHOTI, K., SONOMOTO, K. & ISHIZAKI, A. Purification, identification and effective production of a peptide antibiotic produced by *Lactococcus lactis* IO-1 (JCM 7638). **Annals of the New York Academy of Sciences**, **864**: 422-427, 1995.
- [34]. 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. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **45**: 36-40, 1996.
- [35]. MATSUSAKI, H., CHINACHOTI, K., SONOMOTO, K. & ISHIZAKI, A. A some characteristics of Nisin Z, a peptide antibiotic produced by *Lactococcus lactis* IO-1. **Food Science Technology Institute Tokyo**, **4** (4): 290-294, 1998.

- [36]. MEGHROUS, J., HUOT, E., QUITTELIER, M. & PETITDEMANGE, H. Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis subsp lactis* **Research in Microbiology**, 143, 9: 879-890, 1992.
- [37]. MEHEDINTU, M. & BERG, H. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. Lausanne. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 43: 67-70, 1997.
- [38]. MENENDEZ, R. G. An electromagnetic coupling hypotheses to explain the proton traslocation mechanism in mitochondria, bacteria and chloroplasts. **Medical Hypotheses**, Edinburgh. 47: 179-182, 1996.
- [39]. MITTENZWEY, R.; SUBMUTH, R. & MEI, W. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on bacteria. The question of a co-stressing factor. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, Lausanne. 40: 21-27, 1996.
- [40]. OGDEN, K. Nisin: a bacteriocin with a potencial use in brewing. **Journal of the institute of Brewing**, London. 92: 379-383, 1986.
- [41]. OGDEN, K. Cleasing contaminated pitching yeast with nisin. **Journal of the institute of Brewing**, London. 93: 302-307, 1987.
- [42]. PICHKO, V. B. & POVALYAEVA, I. V. Electromagnetic stimulation of microorganism productivity: Possible mechanisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscu. 32(4): 425-428, 1996.
- [43]. RADLER, F. Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeast in solid and liquid media. **American Journal of Enology and Viticulture**, 41(1): 1-6, 1990a.
- [44]. RADLER, F. Possible use of nisin in winemaking. II. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, 41(1): 7-11, 1990b.
- [45]. RAJA, R.; SONOLIKAR, R. L. & PENTU, S. S. Influence of magnetic field on the performance of bubble columns and airlift bioreactor with submerged

- microorganisms. **Chemical Engineering Science**, Amsterdam. 52 (21/22): 4155-4160, 1997.
- [46]. RAYMAN, M. K.; ARIS, B. & HURST, A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. **Applied and Environmental Microbiology**, 41, 2: 375-380, 1981.
- [47]. RODRIGUEZ, J. M.; CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HORN, N.; DODD, H. M.; HERNANDEZ, P. E. & GASSON, M. J. Isolation of nisin producing *L. lactis* strain from dry fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington. 78: 109-115, 1995.
- [48]. SHIMIZU, H., MIZUGUCHI, T., TANAKA, E. & SHIOYA, S. Nisin Production by a mixed-culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65 (7): 3134-3141, 1999.
- [49]. SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**. V 195, p. 19, 1952.
- [50]. TANIGUCHI, M.; HOSHINA, K.; URASAKI, H. & FUJII, M. Continuous production of an antibiotic polypeptide (nisin) by *L. lactis* using a bioreactor coupled to a microfiltration module. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tokyo. 77, 6: 704-708, 1994.
- [51]. VALBERG, P. A.; KAVET, R. & RAFFERTY, C. N. Can low- level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biologicals effects?. **Radiation Research**, Charlottesville. 148: 2-21, 1997.
- [52]. WAN, J.; HICKEY, M. W. & COVENTRY, M. J. Continuous production of bacteriocins, brevicin, nisin and pediocin, using calcium alginate-immobilized bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington. 79: 671-676, 1995.
- [53]. YANG, R. & RAY, B. Factors Influencing production of bacteriocins by acid lactic bacteria. **Food Microbiology**, 11: 281-291, 1994.

8. APÊNDICE

Tabela 12. Resultados obtidos com e sem reciclo celular para 24 horas de fermentação (sem aplicação de campo magnético).

Respostas	Experimentos sem reciclo celular			Experimentos com reciclo celular		
	Exp. S1	Exp. S2	media	Exp. C1	Exp. C2	media
X_o (g/L)	0,16	0,195	0,18	0,175	0,2	0,19
X_F (g/L)	0,74	0,72	0,73	0,685	0,86	0,77
ΔX (g/L)	0,580	0,525	0,55	0,510	0,660	0,59
S_o (g/L)	10,3155	11,184	10,75	9,551	11,4623	10,51
S_F (g/L)	5,7285	5,52	5,62	5,6243	5,798	5,71
ΔS (g/L)	4,587	5,664	5,13	3,927	5,664	4,80
Atividade de nisina (g nis/L) $\times 10^3$	29,01	40,92	34,97	13,66	7,66	10,66
Atividade de nisina (IU/mL)	1160,30	1636,75	1398,53	546,35	306,18	426,27
$Y_{X/S}$	0,126	0,093	0,110	0,130	0,117	0,123
Atividade específica $\times 10^3$ (g de nisina./g de MS)	39,20	56,83	48,02	19,94	8,91	14,43
$Y_{P/S} \times 10^2$	0,632	0,722	0,677	0,348	0,135	0,242
pH_F	4,63	4,58	4,61	4,12	4,08	4,10

Tabela 13. Resultados obtidos nas fermentações realizadas durante 24 horas para o estudo da cinética da produção de nisina por *Lactococcus lactis*.

Experimento	X ₁ Tesla	X ₂ horas	X ₃ m/s
A	0,04	24	0,85
B	0,02	24	0,85
C	0,00	24	0,85

Tempo (h)	Experimento A			Experimento B			Experimento C		
	X (g/L)	ART (g/L)	pH	X (g/L)	ART (g/L)	pH	X (g/L)	ART (g/L)	pH
0	0,02	10,976	6,68	0,120	10,072	6,87	0,225	11,810	6,67
4	0,25	10,350	6,44	0,305	9,412	6,73	0,440	10,559	6,39
8	0,55	7,675	5,69	0,645	7,466	5,94	0,805	7,223	5,32
12	0,63	6,354	4,44	0,735	6,771	4,77	0,880	6,389	4,39
16	0,69	6,041	4,25	0,735	5,833	4,53	0,900	5,833	4,20
20	0,73	6,215	4,25	0,795	6,076	4,49	0,955	5,937	4,09
24	0,69	5,833	4,26	0,770	6,111	4,45	0,985	5,972	4,09

Tabela 14. Valores das respostas obtidas nas fermentações realizadas durante 24 horas para o estudo cinético da produção de nisina por *Lactococcus lactis*.

Experimento	Tempo (h)	ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S} \times 10^2$	Atividade $\times 10^3$ g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica $\times 10^3$ g de nis/g de MS
A	10	0,57	3,960	0,144	0,14	5,42	216,77	9,19
A	12	0,61	4,622	0,132	0,21	9,62	384,87	15,27
A	16	0,67	4,935	0,136	0,15	7,49	299,40	10,86
A	20	0,71	4,761	0,149	0,17	8,17	326,79	11,19
A	24	0,67	5,143	0,130	0,14	7,07	282,71	10,25
B	10	0,57	2,954	0,193	0,53	15,64	625,52	22,67
B	12	0,615	3,301	0,186	0,59	19,61	784,32	26,68
B	16	0,615	4,239	0,145	0,36	15,20	608,13	20,68
B	20	0,675	3,996	0,169	0,37	14,79	591,46	18,60
B	24	0,650	3,961	0,164	0,36	14,41	576,22	18,71
C	10	0,615	5,004	0,123	0,19	9,68	387,00	11,52
C	12	0,665	5,421	0,123	0,38	20,60	823,91	23,41
C	16	0,675	5,977	0,113	0,32	19,34	773,69	21,49
C	20	0,730	5,873	0,124	0,10	5,62	224,89	5,88
C	24	0,760	5,838	0,130	0,15	8,53	341,03	8,66

Tabela 15. Resultados obtidos nas respostas estudadas, seguindo o planejamento fatorial completo 2³ com ponto central.

Nº Exp.	Variáveis codificadas			Variáveis Reais			Respostas						
	X ₁	X ₂	X ₃	B (Tesla)	t (h)	v (m/s)	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇
							ΔX g/L	ΔS g/L	Y _{X/S}	Atividade 10 ³ g de nis/L meio	Y _{P/S} x 10 ²	Atividade Específica x 10 ³ g de nis/g de MS	Atividade IU/mL
1	1	1	1	0,02	12	1,5	0,715	3,440	0,21	5,67	0,16	5,16	226,9
2	1	1	-1	0,02	12	0,85	0,610	4,622	0,13	9,62	0,21	15,27	384,9
3	1	-1	1	0,02	4	1,5	0,545	3,927	0,14	39,69	1,01	44,09	1587,4
4	1	-1	-1	0,02	4	0,85	0,540	4,275	0,13	23,93	0,56	37,10	957,2
5	-1	1	1	0,005	12	1,5	0,720	4,135	0,17	7,12	0,17	8,57	284,7
6	-1	1	-1	0,005	12	0,85	0,615	3,301	0,19	19,61	0,59	26,68	784,3
7	-1	-1	1	0,005	4	1,5	0,505	4,760	0,11	54,08	1,14	86,53	2163,2
8	-1	-1	-1	0,005	4	0,85	0,395	4,761	0,08	15,42	0,32	24,48	616,8
9	0	0	0	0,0125	8	1,175	0,503	5,074	0,10	27,35	0,50	35,82	1093,8
	Controle						0,433	3,764	0,1167	12,25	0,32	18,23	490,03

Tabela 16. Resultados do Experimento #1 do planejamento fatorial completo 2³ com ponto central.

Variáveis	X ₁	X ₂	X ₃
Codificadas	1	1	1
Reais	0,02 Tesla	12 horas	1,5 m/s

Tempo (h)	X (g/L)	ART (g/L)	PH
0	0,385	10,802	6,70
4	0,545	10,201	6,47
8	0,980	8,102	5,68
12	1,100	7,362	4,56

ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ $\times 10^2$	Atividade x 10^3 g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica x 10^3 g de nis/g de MS
0,715	3,440	0,21	0,16	5,67	226,9	5,16

Tabela 17. Resultados do Experimento # 2 do planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Variáveis	X_1	X_2	X_3
Codificadas	1	1	-1
Reais	0,02 Tesla	12 horas	0,85 m/s

Tempo (h)	X (g/L)	ART (g/L)	pH
0	0,02	10,976	6,68
4	0,25	10,350	6,44
8	0,55	7,675	5,69
12	0,63	6,354	4,44

ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ $\times 10^2$	Atividade $\times 10^3$ g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica $\times 10^3$ g de nis/g de MS
0,61	4,622	0,13	0,21	9,62	384,9	15,27

Tabela 18. Resultados do Experimento # 3 do planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Variáveis	X_1	X_2	X_3
Codificadas	1	-1	1
Reais	0,02 Tesla	4 horas	1,5 m/s

Tempo (h)	X (g/L)	ART (g/L)	pH
0	0,355	11,358	6,71
4	0,465	10,842	6,58
8	0,700	8,517	6,04
12	0,900	7,431	4,87

ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ $\times 10^2$	Atividade $\times 10^3$ g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica $\times 10^3$ g de nis/g de MS
0,545	3,927	0,14	1,01	99,69	1587,4	44,09

Tabela 19. Resultados do Experimento # 4 do planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Variáveis	X_1	X_2	X_3
Codificadas	1	-1	-1
Reais	0,02 Tesla	4 horas	0,85 m/s

Tempo (h)	X (g/L)	ART (g/L)	pH
0	0,105	11,845	6,66
4	0,370	10,981	6,39
8	0,635	8,832	5,65
12	0,645	7,570	4,56

ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ $\times 10^2$	Atividade $\times 10^3$ g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica $\times 10^3$ g de nis/g de MS
0,540	4,275	0,13	0,56	23,93	957,2	37,10

Tabela 20. Resultados do Experimento # 5 do planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Variáveis	X_1	X_2	X_3
Codificadas	-1	1	1
Reais	0,005 Tesla	12 horas	1,5 m/s

Tempo (h)	X (g/L)	ART (g/L)	pH
0	0,110	11,219	6,82
4	0,500	10,517	6,61
8	0,680	8,201	5,92
12	0,830	7,084	4,69

ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ $\times 10^2$	Atividade $\times 10^3$ g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica $\times 10^3$ g de nis/g de MS
0,720	4,135	0,17	0,17	7,12	284,7	8,57

Tabela 21. Resultados do Experimento # 6 do planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Variáveis	X_1	X_2	X_3
Codificadas	-1	1	-1
Reais	0,005 Tesla	12 horas	0,85 m/s

Tempo (h)	X (g/L)	ART (g/L)	pH
0	0,120	10,072	6,87
4	0,305	9,412	6,73
8	0,645	7,466	5,94
12	0,735	6,771	4,77

ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ $\times 10^2$	Atividade $\times 10^3$ g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica $\times 10^3$ g de nis/g de MS
0,615	3,301	0,19	0,59	19,61	784,3	26,68

Tabela 22. Resultados do Experimento # 7 do planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Variáveis	X_1	X_2	X_3
Codificadas	-1	-1	1
Reais	0,005 Tesla	4 horas	1,5 m/s

Tempo (h)	X (g/L)	ART (g/L)	pH
0	0,120	12,435	6,76
4	0,310	11,201	6,49
8	0,600	8,341	6,04
12	0,625	7,675	4,69

ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ $\times 10^2$	Atividade $\times 10^3$ g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica $\times 10^3$ g de nis/g de MS
0,505	4,760	0,11	1,14	54,08	2163,2	86,53

Tabela 23. Resultados do Experimento # 8 do planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Variáveis	X_1	X_2	X_3
Codificadas	-1	-1	-1
Reais	0,005 Tesla	4 horas	0,85 m/s

Tempo (h)	X (g/L)	ART (g/L)	pH
0	0,235	12,644	6,65
4	0,415	11,271	6,46
8	0,580	8,353	6,08
12	0,630	7,883	5,15

ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ $\times 10^2$	Atividade $\times 10^3$ g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica $\times 10^3$ g de nis/g de MS
0,395	4,761	0,08	0,32	15,42	616,8	24,48

Tabela 24. Resultados do Experimento # 9 do planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Variáveis	X ₁	X ₂	X ₃
Codificadas	0	0	0
Reais	0,0125 Tesla	8 horas	1,175 m/s

Tempo (h)	X (g/L)	ART (g/L)	pH
0	0,224	12,923	6,75
4	0,355	11,706	6,60
8	0,555	8,926	5,80
12	0,725	7,849	4,63

ΔX g/L	ΔS g/L	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ $\times 10^2$	Atividade $\times 10^3$ g de nis/L	Atividade IU/mL	Atividade Específica $\times 10^3$ g de nis/g de MS
0,503	5,074	0,10	0,50	27,35	1093,8	35,82

Tabela 25. Efeitos principais e seus erros padrões determinados para a variável resposta Y_1 (Produção de massa celular seca (g/L)).

Fatores	Efeito	Erro padrão
Média	0,572*	$\pm 0,018$
Indução Magnética (X_1)	0,044	$\pm 0,037$
Tempo de tratamento magnético (X_2)	0,169*	$\pm 0,037$
Velocidade do reciclo celular (X_3)	0,081	$\pm 0,037$

*Efeitos significativos para o nível de confiança de 95%

Tabela 26. Efeitos principais e seus erros padrões determinados para a variável resposta Y_2 (Consumo de ART (g/L)).

Fatores	Efeito	Erro padrão
Média	4,255*	$\pm 0,225$
Indução Magnética (X_1)	-0,173	$\pm 0,477$
Tempo de tratamento magnético (X_2)	-0,556	$\pm 0,477$
Velocidade do reciclo celular (X_3)	-0,174	$\pm 0,477$

Tabela 27. Efeitos principais e seus erros padrões determinados para a variável resposta Y_3 (Rendimento biomassa/substrato, $Y_{X/S}$).

Fatores	Efeito	Erro padrão
Média	0,140*	0,011
Indução Magnética (X_1)	0,015	$\pm 0,239$
Tempo de tratamento magnético (X_2)	0,060	$\pm 0,239$
Velocidade do reciclo celular (X_3)	0,025	$\pm 0,239$

Tabela 28. Efeitos principais e seus erros padrões determinados para a variável resposta Y₄ (Atividade de nisina (g/L de meio)).

Fatores	Efeito	Erro padrão
Média	0,023*	±0,004
Indução Magnética (X ₁)	-0,004	±0,009
Tempo de tratamento magnético (X ₂)	-0,023	±0,009
Velocidade do reciclo celular (X ₃)	0,009	±0,009

*Efeitos significativos para o nível de confiança de 95%

Tabela 29. Efeitos principais e seus erros padrões determinados para a variável resposta Y₅ (Rendimento Produto/substrato, Y_{P/S}).

Fatores	Efeito	Erro padrão
Média	0,005*	±0,001
Indução Magnética (X ₁)	-0,001	±0,002
Tempo de tratamento magnético (X ₂)	-0,005	±0,002
Velocidade do reciclo celular (X ₃)	0,002	±0,002

Tabela 30. Efeitos principais e seus erros padrões determinados para a variável resposta Y₆ (Atividade específica (g nisina/ g MS)).

Fatores	Efeito	Erro padrão
Média	0,032*	0,007
Indução Magnética (X ₁)	-0,011	±0,014
Tempo de tratamento magnético (X ₂)	-0,034	±0,014
Velocidade do reciclo celular (X ₃)	0,010	±0,014

Tabela 31: Resultados obtidos para os experimentos controles.

Experimentos Controles	X _O (g/L)	X _F (g/L)	S _O (g/L)	S _F (g/L)
1	0,250	0,680	11,636	7,848
2	0,310	0,735	11,462	7,223
3	0,140	0,585	11,462	8,196
Média	0,2333	0,67	11,520	7,756

Experimentos Controles	Tempo (h)	ΔX g/L	ΔS g/L	Y _(x/s)	Atividade x 10 ³ g de nis/L	Y _(p/s) x 10 ²	Atividade Específica x 10 ³ g de nis/g de MS	Atividade IU/mL
1	12	0,430	3,788	0,11	7,85	0,21	11,54	313,98
2	12	0,425	4,239	0,10	17,93	0,42	24,40	717,37
3	12	0,445	3,266	0,14	10,97	0,34	18,75	438,75
Média		0,433	3,764	0,1167	12,250	0,32	18,23	490,03
Desvio Padrão		0,0104	0,4869	0,0182	5,1605	0,11	6,45	206,53
Variância		0,0001	0,2371	0,0003	0,027	0,0001	0,042	42653,36

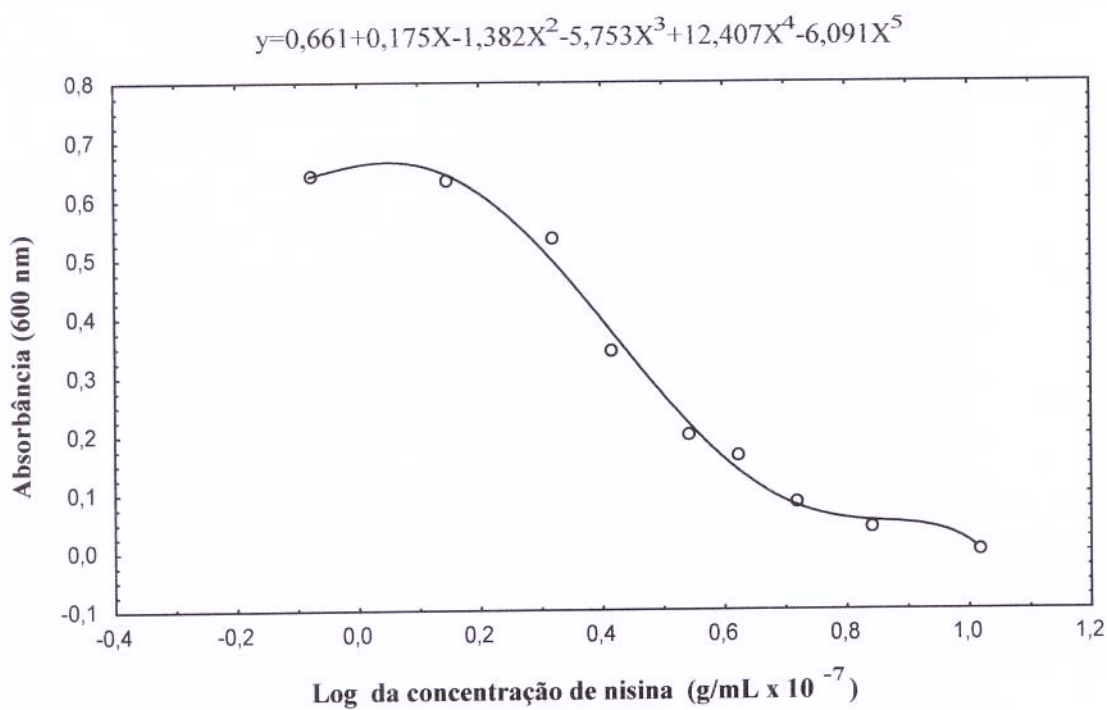


Figura 11. Curva padrão para determinação de atividade de nisina.

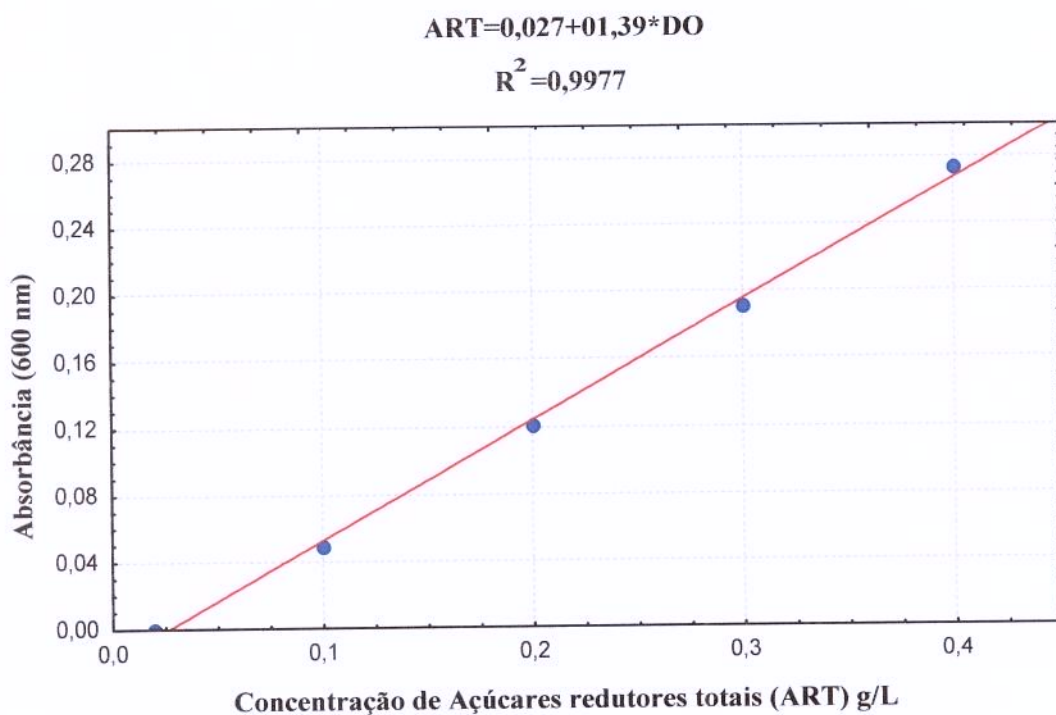


Figura 12. Curva padrão de Somogyi - Nelson para determinação de açúcares redutores totais.