

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM ENGENHARIA AGRÍCOLA:
RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL

**OBTENÇÃO DE BACTERIOCINA DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE
INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA**

RAQUEL MINUCELI VILVERT

CASCAVEL – PARANÁ
FEVEREIRO, 2019

RAQUEL MINUCELI VILVERT

**OBTENÇÃO DE BACTERIOCINA DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE
INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola como cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, na Área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientação: Profa. Doutora Simone Damasceno Gomes

Coorientação: Profa. Doutora Luciane Senne e Profa. Doutora Sílvia Coelho

CASCAVEL – PR.

FEVEREIRO 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Vilvert, Raquel Minuceli Vilvert
OBTENÇÃO DE BACTERIOCINA DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM ÁGUA
RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA / Raquel
Minuceli Vilvert Vilvert; orientador(a), Simone Damasceno
Gomes Gomes; coorientador(a), Luciane Senne Senne,
coorientador(a)II, Silvia Coelho Coelho, 2019.
93 f.

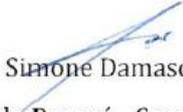
Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Exatas e
Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Agrícola, 2019.

1. Bactérias do Ácido lático. 2. Fermentação. 3. Resíduo
agroindustrial. I. Gomes, Simone Damasceno Gomes. II.
Senne, Luciane Senne . III. Coelho, Silvia Coelho. IV.
Título.

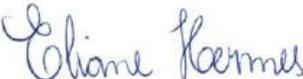
RAQUEL MINUCELI VILVERT

Obtenção de bacteriocina de bactérias lácticas em água residuária de indústria de fécula de mandioca

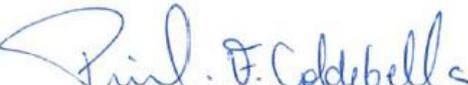
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, linha de pesquisa Saneamento Ambiental, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) -  Simone Damasceno Gomes

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Eliane Hermes

Universidade Federal do Paraná (UFPR)


Priscila Ferri Coldebella

União Dinâmica de Faculdades Cataratas


Luciana Bill Mikito Kottwitz

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Silvia Renata Machado Coelho

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 5 de fevereiro de 2019.

BIOGRAFIA

Raquel Minuceli Vilvert nasceu em 10 de março de 1986, em Iporã Paraná. Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Paranaense (2007), Mestrado em Biotecnologia Aplicado à Agricultura pela Universidade Paranaense (2013). Em fevereiro de 2015 iniciou o curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, nível de doutorado, na área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná Campus Cascavel, orientada pela Prof. Dra. Simone Damasceno Gomes. Atualmente é Técnica de Laboratório/Química da Universidade Federal do Paraná.

*“Que todos os nossos esforços estejam sempre
focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes
conquistas humanas vieram daquilo que parecia
impossível.”*

Charles Chaplin.

A Dirce e Raul meus queridos pais,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre.

À minha orientadora, Dra Simone Damasceno Gomes, pelo aprendizado, confiança e amizade.

Aos meus pais, pelo amor, educação, incentivo e apoio incondicional.

Agradeço aos meus irmãos Danilo, Felipe, Davi e Júlia, pelo amor, carinho e companheirismo.

Ao meu noivo Leandro, pelo amor, paciência e incentivo.

Aos meus colegas de trabalho da UFPR, Aline, Guilherme, Larissa e Maiara, que não mediram esforços para suprimir minha ausência para a realização deste trabalho.

À minha amiga Dilcemara pelo carinho, incentivo e ombro amigo.

Aos meus colegas de laboratório Aruani, Ana Paula, Kauanna, Tamiris, José, Giovane e Paula, que sempre me ajudaram, pela companhia, pelo apoio e paciência.

À UNIOESTE *campus* de Cascavel em especial ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola por me oportunizar a realização desta etapa de formação acadêmica.

A todos os professores do PGEAGRI, pela transposição dos conhecimentos durante o período de realização dos créditos.

As minhas orientadoras Profa. Dra Luciane Senne e Profa. Dra Silvia Coelho, por sempre estarem prontas para sanar minhas dúvidas.

Aos Técnicos Edison e Euro, pela confiança, ajuda e pela enorme paciência.

Ao Prof. Dr. Paulo Claimont e a Unesp Instituto de Química de Araraquara, pela realização das análises de LC-ms/ms.

E a todos aqueles que contribuíram para a realização deste projeto.

OBTENÇÃO DE BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

RESUMO

As bacteriocinas são produtos do metabolismo de muitas bactérias lácticas e têm atraído interesse dos pesquisadores, por apresentarem atividade antimicrobiana, podendo ser utilizadas na conservação de alimentos e na indústria farmacêutica. Os produtos da mandioca e os resíduos de seu processamento são comumente relacionados com a presença de bactérias lácticas, portanto podem ser considerados substratos para a produção de bacteriocinas, a partir de bactérias lácticas isoladas do próprio resíduo, representando assim uma forma de valorização e de minimização do impacto ambiental gerado por estes resíduos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de bacteriocinas de bactérias lácticas isoladas de resíduos provenientes da agroindústria processadora da mandioca. Foi feito o isolamento de uma bactéria do ácido láctico do resíduo da indústria da mandioca, e avaliado seu potencial para produção de bacteriocinas, além disso, foi utilizado a própria água residuária como substrato para a produção de bacteriocinas. Para isso, foi feito um planejamento experimental de otimização de produção, começando pelo Plackett Burnam (PB) com 5 fatores que poderiam influenciar na produção de bacteriocinas, e observou-se que somente 3 fatores a sacarose, extrato de levedura e sulfato de magnésio têm influência na produção de bacteriocina utilizando água residuária como meio de cultura. Foi feito um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) e a metodologia de superfície de resposta foram adotados para derivar um modelo estatístico para otimização da composição do meio utilizando água residuária da indústria de fécula de mandioca. Foi avaliada a produção de bacteriocina em um reator em bateladas sequenciais utilizando a bactéria isolada como produto de bacteriocina e o meio de cultura a água residuária otimizada. O reator foi monitorado, de forma que, a cada 15 h, realizaram-se as coletas de amostras do efluente para determinação da produção de bacteriocina. O reator foi conduzido por 13 ciclos na condição (i) água residuária otimizada segundo o DCCR autoclavada (121°C/ 15 min), até observar a diminuição da produção de bacteriocina, e por 6 ciclos na condição (ii) água residuária otimizada segundo o DCCR sem autoclavar, até observar a diminuição da produção de bacteriocina. A bactéria isolada produtora de bacteriocina foi a bactéria do ácido láctico *Leuconostoc mesenteroides*. Os resultados mostraram que o meio ótimo para a produção de bacteriocina foi composto por sacarose 18,70 g/L extrato de levedura 14,60 g/L e sulfato de magnésio 1,3g/L, e que a máxima produção de bacteriocina ocorre em 15 horas de fermentação. Quando cultivada em meio ótimo o rendimento de produção de bacteriocina é de 1205,58 Au/mL. Quando a fermentação é realizada em escala maior no reator em bateladas sequenciais apresentam um aumento nos títulos de bacteriocina de 56,76% maior do que o resultado experimental obtido na condição ótima, esse aumento ocorre somente na condição (i), já na condição (ii) A produção de bacteriocina ocorreu somente com 15 horas de fermentação. Por tanto, foi possível identificar a presença de bactérias do ácido láctico e a produção de bacteriocina na água residuária da indústria de fécula de mandioca, bem como otimizar a água residuária para produção de bacteriocina.

Palavras-chaves: Bactérias do ácido láctico; fermentação; resíduo agroindustrial

OBTAINING BACTERIOCIN FROM LACTIC ACID BACTERIA IN CASSAVA WASTEWATER

ABSTRACT

Bacteriocins are products of the metabolism of many lactic acid bacteria and have attracted interest from researchers due to their antimicrobial activity and possibility of use in food preservation and in the pharmaceutical industry. Cassava products and its processing residues are commonly related to the presence of lactic acid bacteria, therefore, those can be considered substrates for the production of bacteriocins from lactic bacteria isolated from the residue itself, thus representing a form of recovery and minimizing the environmental impact generated by these wastes. In this sense, the objective of this work was to evaluate the production of bacteriocins from lactic bacteria isolated of the cassava agroindustrial process residue. The isolation of a lactic acid bacterium from the cassava industry residue was carried out and analyzed regarding its potential for bacteriocin production. In addition, the residue water was used as a substrate for bacteriocin production. For this purpose, an experimental planning for the optimization of the production was developed, beginning with Plackett Burnam (PB) with 5 factors that could influence the production of this bacteriocin. It was observed that only 3 factors, namely, sucrose, yeast extract and magnesium sulfate, played influence on the production of Bacteriocin using wastewater as culture medium. A rotational central composite experimental design (DCCR) was employed, and for the derivation in the methodology of response surface, a statistical model of optimization of the composition of the culture medium was adopted, using waste water from corn starch industry. The bacteriocin production was evaluated in a reactor, in sequential batch, using the bacteria isolated as bacteriocin product and optimized residual water as culture medium. The reactor was monitored at every 15 hours and samples of the effluente were collected to determine bacteriocin production. The reactor was conducted for 13 cycles in condition (i) optimized residual water, according to DCCR, autoclaved (121 °C/15 min) until decrease of bacteriocin could be observed; and for 6 cycles in condition (ii) optimized residual water, according to the DCCR, without autoclaving until decrease in bacteriocin production was observed. The isolated bacterium capable of producing bacteriocin was the lactic acid bacterium *Leuconostoc Mesenteroides*. The results showed that the optimum culture medium for bacteriocin production was composed of sucrose 18.70 g/L yeast extract 14.60 g/L, and magnesium sulfate 1.3 g/L, and that the maximum production of bacteriocin happens in 15 hours of fermentation. When cultivated in optimum culture medium, the yield of bacteriocin is 1205.58 Au/mL. When fermentation is carried out on a larger scale, in the reactor, through sequential batch, bacteriocin levels increases up to 56.76% higher than the experimental result obtained in the optimum condition and this increase occurs only in condition (i), since (ii) Bacteriocin production occurred only after 15 hours of fermentation. Therefore, it was possible to identify the presence of lactic acid bacteria, as well as the production of bacteriocin in the wastewater of the cassava starch industry, as well as to optimize the residual water for bacteriocin production.

Key-words: Lactic acid bacteria; fermentation; agroindustrial wastewater.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo geral	3
2.2	Objetivos específicos	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	A cultura de mandioca, seu processamento e a geração de resíduos	4
3.2	Bactérias do ácido lático	6
3.3	Utilização das bactérias do ácido lático	8
3.4	<i>Leuconostoc ssp.</i>	9
3.5	Bacteriocinas	11
3.6	Bacteriocinas produzidas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14
3.7	Fatores que afetam o crescimento das bactérias lácticas e a produção de bacteriocinas	16
3.8	Considerações Finais	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	Coleta dos resíduos	19
4.2	Caracterização físico-química dos resíduos utilizados como substrato para a produção de bacteriocinas	19
4.3	Obtenção de bactérias do ácido lático (bal) produtoras de bacteriocinas	20
4.3.1	Isolamento das bactérias do ácido lático de resíduos do processamento da mandioca	20
4.3.2	Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados	21
4.4	Otimização da produção de bacteriocinas em água residuária da indústria de fécula de mandioca	21
4.5	Identificação molecular do isolado	26
4.6	Métodos analíticos	26
4.7	Determinação da atividade de bacteriocinas	26
4.8	Determinação de bacteriocinas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)	27
4.9	Determinação da produção de bacteriocinas em reator em bateladas sequenciais ..	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Isolamento e identificação das cepas de BAL isoladas de resíduos do processamento de mandioca	30

5.2	Produção de bacteriocinas em meio sintético.....	39
5.3	Otimização da produção de bacteriocinas em água residuária da indústria de fécula de mandioca.....	41
5.4	Análise da superfície de resposta do DCCR.....	45
5.5	Otimização da produção de bacteriocinas	47
5.5.1	Obtenção do ponto ótimo para o processo de produção de bacteriocina.....	47
5.5.2	Obtenção da cinética de produção de bacteriocinas utilizando água residuária autoclavada e enriquecida.....	48
5.6	Determinação da produção de bacteriocinas em reator em bateladas sequenciais..	52
5.6.1	Produção de bacteriocinas em reator em bateladas sequenciais utilizando água residuária autoclavada	52
5.6.2	Produção de bacteriocinas em reator em bateladas sequenciais (AnSBR) utilizando água residuária otimizada segundo o DCCR não autoclavada	57
6	CONCLUSÕES	62
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	REFERÊNCIAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química da raiz da mandioca por 100 gramas.....	5
Tabela 2	Composição de aminoácidos das raízes da mandioca (g/100g)	5
Tabela 3	Composição da água residuária da indústria da fécula de mandioca utilizada como substrato para a produção de bacteriocina	20
Tabela 4	Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental fatorial Plackett Burman para a produção de bacteriocinas	22
Tabela 5	Condições experimentais codificadas do planejamento experimental Plackett Burman com quatro repetições no ponto central para a produção de bacteriocinas	22
Tabela 6	Variáveis independentes e níveis do planejamento composto central rotacional (DCCR).....	23
Tabela 7	Condições experimentais codificadas do planejamento experimental composto rotacional (DCCR) com três repetições no ponto central	24
Tabela 8	Parâmetros utilizados para o experimento de MRM.....	28
Tabela 9	Produção de bacteriocinas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em meio sintético MRS, após 15 e 36 horas de fermentação.....	40
Tabela 10	Matriz do planejamento experimental Plackett Burman com os valores reais em g/L e suas respostas para a produção de bacteriocinas em Au/mL	41
Tabela 11	Matriz do planejamento experimental DCCR com os valores reais e codificados das variáveis independentes e os valores obtidos para bacteriocinas, eficiência de remoção de DQO, eficiência de remoção de açúcares totais, ácido lático, ácido acético, massa seca e pH, após 36 horas de fermentação.....	42
Tabela 12	Análise da variância (ANOVA) para a variável resposta produção de bacteriocinas	45
Tabela 13	Análises da produção de bacteriocinas, produção de ácido lático, produção de ácido acético, eficiência de remoção de DQO, eficiência de remoção de açúcar, massa seca, retirada a cada 5 horas durante a fermentação em frascos de agitação, para obtenção da cinética de produção de bacteriocina.....	48
Tabela 14	Resultados obtidos nos ensaios de fermentação em reator em bateladas sequenciais com água residuária autoclavada e otimizada de acordo com o DCCR.....	52
Tabela 15	Produção de bacteriocinas, produção de ácido lático e ácido acético, eficiências de remoção de DQO e de açúcares, pH final para cada ciclo de fermentação no reator AnSBR com água residuária não autoclavada.....	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Via de fermentação da glicose por bactérias lácticas homofermentativas e heterofermentativas..... 7
- Figura 2** Reator operado em bateladas sequenciais (MANSSOURI, 2012) 1. Reator em Pexiglass; 2. Entrada afluyente; 3. Bomba peristáltica dosadora entrada; 4. Bomba peristáltica dosadora de descarga; 5. Saída efluente; 6.Sistema de agitação; 7. Sistema de automação..... 29
- Figura 3** Bactéria isolada em ágar M-17: a) forma branca leitosa e circular; b) cocos gram positivos. 30
- Figura 4** Teste de antagonismo com formação do halo de inibição do crescimento de *Lactococcus sakei*. 31
- Figura 5** Cromatograma de íons totais (TIC), cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 671 ($[M+5H]^{5+}$) e respectivo espectro de massas da banda detectada em 11,05 min da amostra de padrão comercial de nisina A..... 32
- Figura 6** Espectros de íons fragmentos de m/z 1678, 1119, 839 e 671 com energia de colisão de 25.0 V, respectivamente. 33
- Figura 7** Espectros de íons fragmentos de m/z 1678, 1119, 839 e 671 com energia de colisão de 45.0 V, respectivamente. 34
- Figura 8** TIC (MRM) para nisina A e XIC para as transições 671>811, 671>216, 671>197, 839>266, 839>1081 e 839>216, respectivamente..... 35
- Figura 9** Ensaio 16 do PB: XIC de m/z 671, 675, 632, 635, 670, 784, 652 e espectros de massas das bandas em 9,5, 10,1, 10,5, 11,1 e 11,6 min, respectivamente. 36
- Figura 10** Amostra de meio sintético MRS fermentado: XIC de m/z 671, 675, 632, 635, 670, 784, 652 e espectros de massas das bandas em 9,5, 10,1, 10,5, 11,1 e 11,6 min, respectivamente. 37
- Figura 11** Espectros de íons fragmentos das massas m/z 671, 675, 632, 635, 667, 670, 784 e 652 da amostra 1..... 38
- Figura 12** Gráfico de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no planejamento experimental Plackette Burman, para a produção de bacteriocinas..... 42
- Figura 13** Gráfico de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no delineamento central composto rotacional, para a produção de bacteriocina. 43

Figura 14	Superfície de resposta para produção de bacteriocinas em função das variáveis sulfato de magnésio e extrato de levedura.	46
Figura 15	Ponto ótimo para produção de bacteriocinas, determinado pelo método de desejabilidade.....	47
Figura 16	Cinética de produção de bacteriocina em função do tempo.....	49
Figura 17	Produção de bacteriocinas e eficiência de remoção de açúcar e de DQO em função do tempo de fermentação.	50
Figura 18	Produção de bacteriocina e formação de ácido láctico e ácido acético em função do tempo de fermentação.	51
Figura 19	Produção de bacteriocinas pela linhagem <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em água residuária da indústria de fécula de mandioca autoclavada em reator AnSBR. .	53
Figura 20	Produção de bacteriocinas e formação de massa seca pela linhagem <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca autoclavada.	54
Figura 21	Produção de bacteriocinas e eficiência de remoção de DQO e de açúcares totais pela linhagem <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca autoclavada.....	55
Figura 22	Curva de produção de bacteriocinas e formação de ácido láctico e ácido acético pela linhagem <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca autoclavada.....	56
Figura 23	Produção de bacteriocinas pela linhagem <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada.	58
Figura 24	Curva de produção de bacteriocinas e formação de massa seca pela linhagem <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada.	59
Figura 25	Produção de bacteriocinas e eficiência de remoção de DQO e açúcares totais pela linhagem <i>Leuconostoc mesenteroides</i> no reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada.	60
Figura 26	Produção de bacteriocinas e formação de ácido láctico e ácido acético pela linhagem <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada.	61

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACN	-	Acetonitrila
AL	-	Ácido láctico
ANOVA	-	Análise de variância
ANVISA	-	Agência de Vigilância Sanitária
AT	-	Concentração de açúcares totais
AU	-	Unidades arbitrárias
BAL	-	Bactérias do ácido láctico
BHI	-	Infusão de cérebro e coração
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCCR	-	Delineamento composto central rotacional
DQO	-	Demanda química de oxigênio
EPI	-	<i>Enhanced product ion</i>
FDA	-	Food and Drug Administration
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC-MS/MS	-	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
MRM	-	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MRS	-	<i>Man Rogosa and Sharpe</i>
OD	-	Densidade optica
PB	-	Plackett Burman
SST	-	Sólidos suspensos totais
ST	-	Sólidos totais
SV	-	Sólidos totais voláteis
TGE	-	Extrato de glicose triptona
TIC	-	Cromatograma de íons totais
TSA	-	Ágar triptona de soja
TSB	-	Caldo de soja tripticase
XIC	-	Cromatograma de íons extraídos

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura alimentar e tem contribuído de forma bastante expressiva para compor a cesta básica, em especial de países da África, Ásia e América Latina, devido às condições edafoclimáticas favoráveis desses continentes. Além de ser utilizada para o consumo alimentar dos homens e animais, a mandioca também é utilizada para a produção de combustível.

O processamento da mandioca, para a produção de fécula e farinha, gera grandes quantidades de resíduos líquidos e sólidos que, muitas vezes, são dispostos de maneira inadequada no meio, levando a sérios problemas ambientais. A busca por aplicações tecnológicas dos resíduos da mandioca permite a sua valorização e, ao mesmo tempo, a minimização da poluição ambiental.

A água residuária da agroindústria processadora da mandioca é considerada de elevado valor nutricional, tendo sido avaliada como meio para processos biotecnológicos, tais como, produção de etanol, compostos voláteis, ácido cítrico, álcool fenilético e ácido láctico. Além de meio rico em nutrientes, as águas residuárias da transformação da mandioca também apresentam biota autóctone, com microrganismos de interesse biotecnológico. As bactérias lácticas são exemplos de microrganismos que, normalmente, aparecem vinculados aos produtos e resíduos da mandioca e têm importância na obtenção de polvilho azedo e ácido láctico.

As bactérias lácticas também aparecem relacionadas à produção de bacteriocinas. Pesquisas mostram a presença da bacteriocina nisina em água residuária da produção de farinha de mandioca. As bacteriocinas são definidas como pequenos peptídeos que podem apresentar atividade antimicrobiana, por possuírem atividade bactericida contra algumas bactérias Gram positivas, incluindo microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos, o que possibilita sua utilização como conservantes de alimentos.

No Brasil a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite o uso da nisina como conservante alimentar em produtos lácteos, como queijos e requeijões, na concentração de 12,5 mg.Kg⁻¹ de produto final.

A busca por novos conservantes naturais tem atraído interesse de pesquisadores, pois cada vez mais a população tem mostrado interesse em consumir alimentos processados, mas que ainda mantenham suas características próximas às do produto natural.

Como os produtos e os resíduos do processamento da mandioca são comumente relacionados à presença de bactérias lácticas, poderiam ser considerados substratos para a

produção de bacteriocinas, a partir de bactérias lácticas isoladas do próprio resíduo. Para tanto, é interessante realizar a otimização de um meio de cultura e a validação da produção de bacteriocinas utilizando a água residuária da indústria de fécula de mandioca como substrato.

Dessa forma, espera-se reduzir o custo do meio de cultura pelo aproveitamento de resíduos da agroindústria local, bem como desenvolver tecnologias, processos e conhecimentos que viabilizem o uso eficiente desses recursos aumentando sua viabilidade econômica, minimizando o impacto ambiental e valorizando o resíduo da agroindústria processadora da mandioca.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produção de bacteriocinas por bactérias láticas em efluente de fecularia de mandioca.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias láticas dos resíduos de indústrias processadoras de mandioca, com potencial de produção de bacteriocinas;
- Avaliar a produção de bacteriocinas em meio sintético, a partir das bactérias isoladas das águas residuárias das indústrias processadoras de mandioca;
- Avaliar a produção de bacteriocinas a partir da bactéria lática isolada, utilizando como substrato a água residuária de indústria de fécula de mandioca;
- Otimizar a composição da água residuária da indústria de fécula de mandioca, para utilizar como substrato na produção de bacteriocinas, a partir da bactéria lática isolada;
- Avaliar a produção de bacteriocinas em reator em bateladas sequenciais, a partir da bactéria lática isolada, utilizando como substrato a água residuária de indústria de fécula de mandioca otimizada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cultura de mandioca, seu processamento e a geração de resíduos

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um arbusto alto com 1 a 2 m, perene, lenhosa, tropical da família *Euphorbiaceae*, cultivada por suas raízes tuberosas ricas em amido (ADETUNJIA et al., 2016; ZHANG et al., 2016; KURIA et al., 2017). Sendo composta pela parte aérea com um tronco e ramos sobre ele. A parte subterrânea é composta por dois tipos de raízes: as responsáveis pela nutrição das plantas e as que são partes comestíveis da planta, com disposição axial em torno do tronco. Cada planta pode ter de 5 a 20 raízes tuberosas e cada uma delas pode atingir comprimento de 20 a 80 cm e diâmetro de 5 a 10 cm. O peso fresco de cada raiz tuberosa pode variar entre algumas centenas de gramas a cinco quilos. (PANDEY et al., 2000).

A mandioca serve como importante cultura alimentar para milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América Latina (ADETUNJIA et al., 2016; KURIA et al., 2017). A América do Sul é o local onde essa cultura foi domesticada há milhares de anos. Na África foi introduzida durante o século XVI, tornando-se uma fonte importante de alimento para famílias de baixa renda que vivem em áreas rurais e, também, uma fonte de renda, principalmente, para pequenos produtores. Na Ásia a cultura da mandioca foi introduzida há cerca de duzentos anos e o objetivo do seu cultivo é a exportação de produtos industrializados, como pedaços secos de amido para a alimentação animal e também para a produção de combustível (PINTO-ZEVALLOS; PAREJA; AMBROGI, 2016).

Nigéria, Brasil e Tailândia são considerados os maiores produtores de mandioca do mundo (ADEKUNLE; ORSAT; RAGHAVAN, 2016). Segundo dados da Embrapa no ano de 2017, o Estado do Paraná foi responsável por 14,79% da produção brasileira de mandioca, com elevada produtividade de 24.234,95 Kg/ha.

A mandioca pode crescer em solos pobres e ácidos e que, muitas vezes, não são adequados para outras culturas; a colheita pode ser realizada em épocas de seca, quando todas as outras culturas não se desenvolvem, justamente, pela falta de água (KOSTINEK et al., 2007; PINTO-ZEVALLOS; PAREJA; AMBROGI, 2016). Por possuir essas características, a mandioca ocupa a quarta posição na lista das principais culturas alimentares nos países em desenvolvimento, depois do arroz, trigo e milho (KOSTINEK et al., 2007).

Em relação à segurança alimentar da cultura da mandioca, esta depende das diversas características da planta, que acumula o amido no parênquima da raiz, em função disso esse órgão se torna uma fonte de carboidratos, vitamina C, riboflavina, tiamina e niacina (PINTO-ZEVALLOS; PAREJA; AMBROGI, 2016).

Na Tabela 1 é apresentada a composição média das raízes da mandioca.

Tabela 1 Composição química da raiz da mandioca por 100 gramas

Composição	Quantidade
Energia	25 (kcal)
Proteína	0,60 (g)
Lipídeos totais	0,30 (g)
Carboidratos	30,10 (g)
Fibra alimentar	1,60 (g)
Cálcio	0,019 (g)
Magnésio	0,027 (g)
Fósforo	0,022 (g)
Potássio	0,286 (g)

Fonte: IBGE (2009).

As raízes da mandioca (*Manihot esculenta*) também são compostas por quantidades significativas de vitaminas e aminoácidos, principalmente de vitamina C, tiamina, riboflavina e niacina, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 Composição de aminoácidos das raízes da mandioca (g/100g)

Aminoácidos	Quantidade
Treonina	2,08 (g)
Valina	2,78 (g)
Metionina	0,70 (g)
Isoleucina	2,08 (g)
Leucina	3,80 (g)
Fenilalanina	2,80 (g)
Lisina	0,35 (g)
Total	59,11 (g)

Fonte: FAO (1997).

Nas indústrias de processamento da mandioca para a obtenção da fécula ou da farinha são geradas grandes quantidades de resíduos. Na produção da farinha, gera-se maior quantidade de resíduos sólidos, como a casca marrom, entrecascas, raízes inutilizáveis e farelo das raspas e no processo de extração da fécula é maior a quantidade de resíduos líquidos (SOCCOL; VANDENBERGHE 2003; LEITE; ZANON; MENEGALLI, 2016).

A água residuária da fecularia, gerada nas operações de extração da fécula, lavagem e descascamento das raízes, apresenta demanda química de oxigênio (DQO) entre 3 e 15 g.L⁻¹ (TORRES et al., 2017), concentração de açúcares totais de 2,5 a 4,6 g.L⁻¹ (ANDREANI et al., 2015) e sais minerais. O pH deste efluente pode variar entre 4,5 a 6,5 (PALMA et al., 2018). Por se tratar de um efluente que dispõe de uma alta concentração de açúcar prontamente disponível e facilmente biodegradada, essa água residuária apresenta potencial para se tornar substrato para processos biotecnológicos (NITSCHKE; PASTORE 2006, ANDREANI et al., 2019).

De acordo com MOSHI et al. (2015), para cada unidade de mandioca crua processada em forma de gari na Nigéria gera-se 30% de resíduo sólido, 20% de resíduo líquido e 16% de resíduo gasoso. A disposição inadequada desses resíduos pode prejudicar o meio ambiente, portanto, encontrar aplicações para os resíduos da mandioca deve contribuir para reduzir os problemas ambientais (MOSHI et al., 2015; ADEKUNLE; ORSAT; RAGHAVAN, 2016; LEITE; ZANON; MENEGALLI, 2016).

3.2 Bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico (BAL) são Gram-positivas sem motilidade e não formadoras de esporos. Têm forma de coco e, como produto principal da fermentação de carboidratos e álcoois superiores, produzem ácido láctico. São não-patogênicas e, geralmente, são consideradas como seguras (GRAS), de acordo com a *US Food and Drug Administration* (FDA) (STILES; HOLZAPFEL, 1997; SIKORA et al., 2013; WANG et al., 2016). Além disso, são microrganismos encontrados no meio ambiente e, por sua elevada exigência nutricional, são normalmente encontrados em ambientes ricos em carboidratos, aminoácidos e nucleotídeos, mas também podem se adaptar a condições desfavoráveis, o que torna possível habitar em uma gama variada de nichos (SIKORA et al., 2013).

Estas bactérias são importantes para a produção de alimentos e bebidas fermentadas, podendo citar como exemplo a sua utilização por muito tempo para produzir e conservar alimentos, como queijos, legumes em conservas e iogurtes (WANG et al., 2016).

Na fermentação do ácido láctico existem duas vias distintas; fermentação homofermentativa e heterofermentativa. Durante a glicólise há formação de duas moléculas de piruvato que, na fermentação homofermentativa, são convertidos em lactato. Na fermentação heterofermentativa, uma molécula de piruvato é convertida em lactato e a outra em etanol e dióxido de carbono (Figura 1) (MADIGAN et al., 2010; SIKORA et al., 2013).

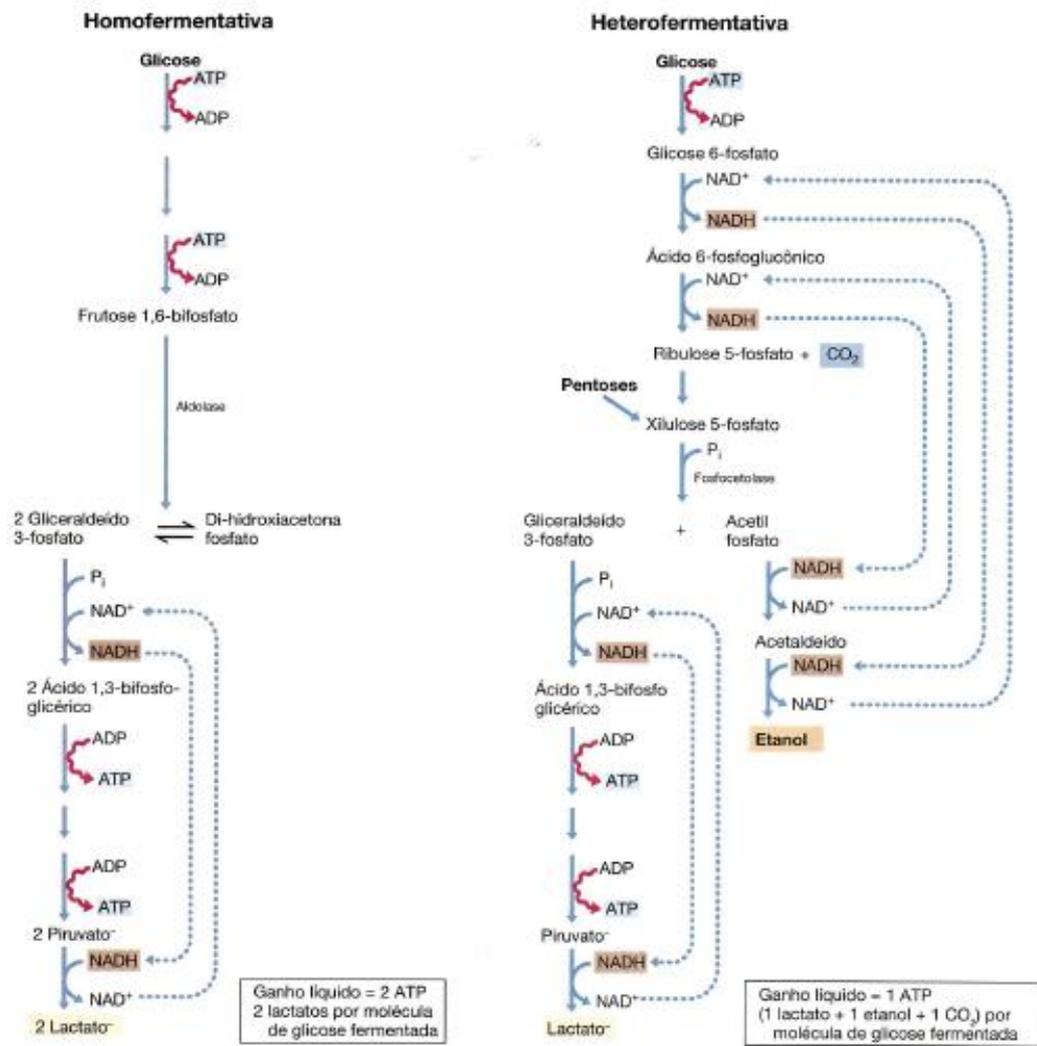


Figura 1 Via de fermentação da glicose por bactérias lácticas homofermentativas e heterofermentativas.

Fonte: Madigan et al. (2010).

Na literatura são relatadas cerca de 400 espécies de bactérias lácticas, pertencentes aos *Lactobacillales* classificados em sete famílias: *Lactobacillaceae* (Gênero: *Lactobacillus* e *Pediococcus*); *Aerococcaceae* (Gênero *Aerococcus*); *Carnobacteriaceae* (Gênero: *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella* e *Lactosphaera*); *Enterococcaceae* (Gênero: *Enterococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus*); *Leuconostocaceae* (Gênero: *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weisella*); *Streptococcaceae* (Gênero: *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Melissococcus*); *Microbacteriaceae* (Gênero *Microbacterium*) (SIKORA et al., 2013).

Bactérias do ácido láctico são encontradas naturalmente em plantas, frutas, legumes, grãos, leite e, também, no trato digestivo de homens e animais. As principais espécies encontradas no ser humano são *Lactobacillus ruminis*, *L. salivarius*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium longum* e *B. breve* e, em razão disso, as BAL têm sido utilizadas como

bactérias probióticas no trato gastrointestinal humano, auxiliando para inibição de patógenos e imunomodulação. Também podem ser adicionadas intencionalmente em produtos como carne e na fermentação de produtos lácteos. O ácido láctico também é utilizado como matéria-prima na indústria para a produção de bioplástico, ácido polilático, em produtos farmacêuticos e cosméticos (CLEVELAND et al., 2001; LIANG; MCDONALD; COATS, 2015).

Os mecanismos que as BAL utilizam para a preservação de alimentos são muito variados. As principais atividades antimicrobianas conhecidas são: redução do pH, devido à síntese de ácidos como ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico, produção de peróxido de hidrogênio, quando na presença de oxigênio, produção de diacetil e excreção de bacteriocinas (NOIKE et al., 2002).

As BAL produtoras de bacteriocinas necessitam de meios complexos para o seu crescimento, aumentando com isso o custo de produção e também a dificuldade para a purificação. Vários meios de cultura têm sido utilizados para cultivar as cepas das BAL como o MRS, M17, M17S, CM, SM8 e permeado de soro de leite (PAPAGIANNI; AVRAMIDIS; FILIOUSIS, 2007).

Bactérias do ácido láctico produzem vários tipos de bacteriocinas que devem ser estudadas, do ponto de vista de sua utilização e efeito, como conservantes naturais de alimentos e antimicrobianos (CLEVELAND et al., 2001).

3.3 Utilização das bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico são muito utilizadas em alimentos, como conservantes e na fermentação de produtos como carne, lácteos, vegetais e produtos de panificação. As BAL, que produzem as bacteriocinas, podem também ser utilizadas na indústria farmacêutica, por possuírem a capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos e, por isso, podem ser exploradas pela indústria farmacêutica para desenvolverem novos antibióticos (CLEVELAND et al., 2001; NOIKE et al., 2002; NOONPAKDEE et al., 2003; PEREZ et al., 2012; ZACHAROF; LOVITT, 2012). Portanto, a descoberta de novas fontes de bacteriocinas com características de uso alimentar ou farmacêutico é necessária.

A utilização das bacteriocinas nos alimentos pode promover a redução do uso de conservantes químicos e ou da intensidade de calor e de outros tratamentos físicos, tornando os alimentos frescos, prontos para consumo e levemente preservados, satisfazendo à necessidade dos consumidores que estão sempre em busca de alimentos

mais naturais. Por isso, tem-se buscado conhecer e desenvolver novas técnicas para aplicações das bacteriocinas nos alimentos (TODOROV, 2009).

O modo de ação das bacteriocinas se baseia na inibição das células alvos pelo ataque dos lipídios aniônicos da membrana citoplasmática, que atuam como receptores primários, ocorrendo então a formação de poros na membrana, esgotando o potencial transmembranar e ou gradiente de pH, resultando na fuga do material celular (CLEVELAND et al., 2001; TODOROV, 2009).

Na literatura são descritos alguns modelos de poros pelos quais as bacteriocinas agem, sendo eles: i) modelo em forma de cunha, utilizado pelas bacteriocinas da classe I, este modelo induz aos poros. ii) modelo barrelstave sugere a formação de poros devido às supostas hélices transmembranares dos peptídeos, capacidade de ligação na membrana e solubilidade em água. As bacteriocinas da classe II usam o mecanismo de tapete, pelo qual os peptídeos se localizam em paralelo às membranas, interferindo na sua estrutura (TODOROV, 2009).

Os alimentos não devem ser conservados somente por bacteriocinas, mas como parte de um sistema que é capaz de romper a membrana celular. Para as bacteriocinas se tornarem mais eficazes devem ser combinados com o uso de outras técnicas, como tratamentos não térmicos como campo elétrico pulsado, pois tem a vantagem de não ter efeito sobre a qualidade nutricional e a funcionalidade dos alimentos. Embora essa técnica seja cara, quando utilizada em conjunto com as bacteriocinas diminui os custos e continua sendo eficaz. As bacteriocinas também podem ser utilizadas junto com outros compostos como acetato de sódio e lactato de sódio, que também auxiliam para uma melhor inativação das bactérias patogênicas. As bacteriocinas agem também contra agentes contaminantes externos, melhorando a segurança alimentar dos alimentos (TODOROV, 2009; ZACHAROF; LOVITT, 2012)

As bacteriocinas têm sido utilizadas como barreira natural contra patógenos, principalmente na deterioração dos alimentos causadas por bactérias e, ainda, conseguem manter as características organolépticas desses produtos. Por isso, são necessárias buscas de novas fontes de bacteriocinas para melhorar a sua aplicabilidade (ZACHAROF; LOVITT, 2012).

3.4 *Leuconostoc ssp.*

O gênero *Leuconostoc* inclui 10 espécies: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc oenos*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc gelidum*,

Leuconostoc carnosum, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc amelibiosum*, que podem ser encontrados em vegetais, legumes fermentados, produtos lácteos e carnes refrigeradas (STILES, 1994).

Microrganismos do gênero *Leuconostoc* podem ser encontrados com grande frequência nos mesmos habitats que os do gênero *Lactobacilos* e *Lactococcus* (THUNELL 1995). Uma forma de diferenciar culturas mistas de *Lactococcus* e *Leuconostoc* é a suplementação do meio M17 com 5% de glicose. Nesse meio, as cepas de *Lactococcus* produzem colônias de tamanho adequado após 24 h de crescimento, enquanto as de *Leuconostoc* requerem 48 horas de crescimento. Outro teste possível para diferenciar essas culturas é a adição de 5% de sacarose ao meio de crescimento M17, em que haverá formação de limo nas colônias de *Leuconostoc* (HEMME; SHEUNEMAMM 2004).

O gênero *Leuconostoc* apresenta as seguintes características: cocos gram positivos, células esféricas muitas vezes lenticulares em ágar, ocorre geralmente em pares e cadeias, não tem motilidade, catalase negativa, não forma esporos, são anaeróbios facultativos, não hemolíticos, resistentes à vancomicina. São considerados não patogênicos e apresentam temperatura ótima para crescimento entre 20 e 30°C. Requerem meio de crescimento complexo, são heterofermentativos e produzem CO₂ a partir do metabolismo da glicose e D-(-)- lactato (TUNNEL, 1995).

Tecnologicamente as cepas *Leuconostoc* produzem baixa quantidade de ácido, e possuem a capacidade de crescer sob condições de stress como, por exemplo, meios ácidos, alto teor de sal e temperaturas altas (PAULA et al., 2014).

As bactérias lácticas do gênero *Leuconostoc* apresentam papel fundamental na formação de aroma e texturas em alguns produtos lácteos, por produzirem acetoína e diacetil. Algumas espécies produzem dextrano que é utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica. Também foi relatado que cepas de *Leuconostoc* podem produzir bacteriocinas, pertencentes à subclasse IIa, que são peptídeos não modificados resistentes ao calor, semelhantes à pediocina, que possuem ativos contra a *Listeria monocytogenes* (CHAMPAGNE; GARDMEN, 2002; HEMME; SCHEUNEMANN, 2004).

Devido a essa eficácia antilisterial, as bacteriocinas da classe IIa têm grande potencial como biopreservadores em uma gama de alimentos (ENNAHAR et al., 2000; XIRAPHI et al., 2008).

3.5 Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos biologicamente ativos, que inativam ou inibem o crescimento de outras bactérias, por possuírem propriedades antimicrobianas. São subprodutos do metabolismo bacteriano, produzido durante a fase primária de crescimento, ocorrendo durante o meio da fase de crescimento exponencial, atingindo o nível máximo no final da fase exponencial ou no início da primeira fase estacionária, sendo sintetizados ribossomicamente, codificados no material genético e transportados pelos plasmídeos (CHEIGH et al, 2002; TODOROV, 2009). Estudos mostram que é comum as bactérias dos ácidos lácticos poderem produzir múltiplas bacteriocinas, podendo produzir até três bacteriocinas diferentes (NES et al., 1996).

As bacteriocinas possuem atividade antagônica ao crescimento bacteriano, suas células produtoras são imunes as suas próprias bacteriocinas, possuem a capacidade de controlar o crescimento de bactérias patogênicas que causam decomposição, normalmente são estáveis ao calor e consideradas de qualidade alimentar, pois são associados à fermentação dos alimentos. Bacteriocinas surgem da necessidade de sobrevivência em ambientes mais povoadas ou em culturas mistas (ZENDO et al., 2007; PEREZ et al., 2012; MALHEIROS et al., 2015; GOMES et al., 2015, RANVEER et al., 2016). A resistência a altas temperaturas, o pH baixo e a sensibilidade às enzimas proteolíticas humanas tornam as bacteriocinas um mecanismo atraente para aplicação na conservação de alimentos (PAULA et al., 2014).

As bacteriocinas possuem como características gerais baixo peso molecular (normalmente não passam de 10 kDa), são moléculas catiônicas, anfipáticas, modificadas após tradução, são rapidamente degradadas por enzimas proteolíticas, especialmente pelas proteases do trato gastrointestinal humano, fazendo com que sejam seguras para consumo humano. Quando incorporadas em soluções aquosas as bacteriocinas não possuem formas, mas quando expostas a solventes como trifluoretano ou com membranas fosfolipídicas aniônicas, formam uma estrutura helicoidal (ZACHAROF; LOVITT, 2012).

A caracterização das bacteriocinas deve ser realizada por meio de estudos do espectro de atividade, modo de ação e dos efeitos do calor, pH, enzimas proteolíticas, sal e detergentes na sua atividade. Inclui-se também a determinação da massa molecular, da composição e da sequência dos aminoácidos, organização genética, produção e secreção das bacteriocinas (TODOROV, 2009).

As bacteriocinas derivadas de bactérias do ácido láctico se diferenciam quanto às características bioquímicas, genéticas e espectro de atividades, porém as bacteriocinas com ligeiras diferenças em suas estruturas ou bacteriocinas diferentes produzidas pela mesma bactéria e com a mesma classificação apresentam espectros antimicrobianos com

diferenças insignificantes ou muitas vezes sem diferença alguma. Possuem como características comuns o alto ponto isoelétrico, baixo peso molecular e a presença de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (ENNAHAR et al., 2000; SCHULZ et al., 2003).

Klaenhammer (1993) classifica as bacteriocinas BAL em classes:

Classe I - conhecida como lantibióticos (peptídeos antibióticos contendo lantionina), são pequenas e inferiores a 5 KDa, com 19 a 38 aminoácidos; uma característica da síntese são os pré-peptídeos constituídos por uma sequência-líder de 14 a 30 aminoácidos na região N-terminal, a qual é removida durante a maturação da proteína. Com base na biossíntese são divididas em tipo Ia- lantibióticos catiônicos formam peptídeos, por exemplo, a nisina, que forma poros na membrana alvo e tem uma estrutura flexível, em comparação com a estrutura mais rígida da classe Ib. O tipo B é compacto, com estruturas globulares, inibidores de enzimas e imunologicamente ativos. Todos os lantibióticos conhecidos atualmente são produzidos por bactérias gram positivas.

Classe II – é formada por peptídeos não-lantionina e estáveis ao calor. Possuem características em comum como glicina, sendo fortemente catiônicas, pH entre 8 e 11; possuem domínios hidrofóbicos e anfífilos; formadas unicamente por aminoácidos, sendo subdivididas em Classe II-a - peptídeos ativos de *Listeria*, com uma sequência N-terminal Tyr-Gly-Asn-Gly-Val e duas cisteínas formando uma ponte S-S, são produzidas por uma grande variedade de bactérias do ácido láctico e foram caracterizadas bioquimicamente. São ativas contra *Listeria spp.* A bacteriocina que representa este grupo é a *Pediocina*. Classe II-b - são bacteriocinas de dois peptídeos que dependem da sua atividade complementar. Classe II-c - algumas bacteriocinas não possuem um peptídeo duplo de glicina, sintetizados com uma sequência líder N-terminal de tipo seg. Classe II-d - são bacteriocinas não-lantionina que não cumprem quaisquer dos critérios dos outros três grupos.

Classe III - é formada por grandes bacteriocinas, maiores que 30 KDa e são termolábeis.

As bacteriocinas da classe I lantibióticos sofrem extensas modificações pós-traducionais e contêm aminoácidos incomuns como, por exemplo, a nisina que é um peptídeo de 34 aminoácidos, ativa contra uma vasta gama de bactérias gram positivas. A diferença das bacteriocinas da classe II que não contém lantionina são bacteriocinas minimamente modificadas, podendo citar como exemplo as lactococinas, pediocinas e a leucocina A, que são peptídeos com 36-44 aminoácidos, inibem a bactéria patogênica *Listeria monocytogenes*, que é responsável por graves infecções do sistema nervoso central, após a absorção de produtos lácteos contaminados (FLEURY et al. 1996).

A maioria das bacteriocinas pertencem às classes I ou II. As bacteriocinas dessas classes são mais fáceis de serem entendidas e utilizadas, por exemplo, em alimentos, por terem especificidade de alvo e por serem robustas (CLEVELAND et al., 2001).

A bacteriocina mais conhecida e utilizada como conservante de alimentos é a nisina. É formada por 34 aminoácidos, incluindo a lantionina e quatro estruturas cíclicas de β metil lantionina. É produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis* e tem o nome derivado do termo “N-inhibitory substances” (NIS) adicionado ao sufixo INA. Tem sido muito utilizada pela indústria alimentícia como conservante de alimentos. Foram identificadas sete variantes de nisina. Nisina A (GROSS; MORELL, 1971), nisina Z (MULDERS et al., 1991), nisina Q (ZENDO et al., 2003), nisina U e U2 (WIRAWAN et al., 2006), nisina F (KWAADSTENIET; DOESCHATE; DICKS, 2008) e nisina H (O’CONNOR et al., 2015). A nisina A e sua variante natural nisina Z, que diferem pela substituição de um aminoácido na posição 27, têm histidina e a nisina Z asparagina (RODRIGUEZ et al., 1995; NOIKE et al., 2002; CHEIGH et al., 2002; NOONPAKDEE et al., 2002; SCHULZ et al., 2003; ZACHAROF; LOVITT, 2012).

A nisina e sua variante natural foram estudadas e aprovadas como eficazes contra agentes microbianos que causam intoxicação alimentar e deterioração. Foi também aprovada como aditivo alimentar seguro (GRAS) nos Estados Unidos, pela *Food and Drug Administration*, 1988. Estudos *in vitro* e de resistência cruzada mostraram que a nisina é segura para consumo humano (CLEVELAND et al., 2001; ZACHAROF; LOVITT, 2012).

A nisina possui atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas, como por exemplo, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus* spp., *Microcococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. Por isso tem sido utilizada como um bom conservante alimentar (CHEIGH et al., 2002; SHI et al., 2017). Uma aplicação da nisina como conservante alimentar é sua utilização combinada com baixa quantidade de nitrito, para impedir o crescimento de *Clostridium* em carnes (CLEVELAND et al., 2001; RAMU et al., 2015).

A única bacteriocina encontrada comercialmente considerada de qualidade alimentar é a nisina que é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis subsp. lactis*. A produção comercial é feita através da fermentação em larga escala com meios que contenham ingredientes de qualidade alimentar (LIU et al., 2003; CHIKINDAS et al., 2018).

A nisina não é considerada um conservante natural quando as concentrações utilizadas excedem o que é encontrado em alimentos fermentados naturalmente com a presença desta bacteriocina (CLEVELAND et al., 2001). O fato de ser considerada como conservante natural seguro (GRAS) confere às bacteriocinas uma vantagem importante sobre os antibióticos comuns no ponto de vista legal, na sua utilização em aplicações alimentares (PEREZ et al., 2012).

Portanto, existem algumas diferenças entre antibióticos e bacteriocinas. A aplicação da bacteriocinas é, principalmente, em alimentos, enquanto os antibióticos têm aplicação clínica. A formação das bacteriocinas é ribossomal, tem um estreito espectro de atividade e são hospedeiros de células imunológicas. Têm como células alvos, em geral, adaptações

que afetam a composição da membrana celular. Os requisitos de interação e modo de ação das bacteriocinas são, na maioria das vezes, biossíntese da parede celular, as bacteriocinas também não possuem toxicidades. Os antibióticos têm sua formação por meio de metabólitos secundários, possuem um amplo espectro de atividade, não são hospedeiros de células imunológicas, possuem como células alvo as que são geneticamente transmissíveis e podem afetar locais diferentes dependendo do modo de ação dos antibióticos. Os requisitos de interação e o modo de ação dos antibióticos são específicos da membrana celular ou intracelular. Os antibióticos também podem possuir toxicidade (CLEVELAND et al., 2001)

Desse modo, para as bacteriocinas se diferenciarem dos antibióticos clínicos devem ser utilizadas somente para controlar o crescimento dos patógenos nos alimentos (ZACHAROF; LOVITT, 2012).

3.6 Bacteriocinas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides*

Algumas espécies de *Leuconostoc* podem produzir bacteriocinas como, por exemplo, *Leuconostoc mesenteroides* isolada de salsicha fermentada tradicional grega produz uma bacteriocina denominada mesenterocina E 131 que é ativa contra o patógeno *Listeria monocytogenes* (XIRAPHI et al., 2008). Outras bacteriocinas também foram descobertas isoladas de diferentes fontes, podendo ser citada a mesenterocina 5 (DABA et al., 1991), mesenterocina 52 (MATHIEU et al., 1993), mesenterocina 52 A e mesenterocina 52 B (REVOL-JUNELLES et al., 1996) mesenterocina Y105 (HÉCHARD et al., 1999), Leucocina A, Leucocina B e Leucocina C produzidas pela mesma cepa *Leuconostoc mesenteroides* TA33a (PAPATHANASOPOULOS et al., 1997), leucocyclicin Q que é a primeira bacteriocina cíclica descoberta de *Leuconostoc mesenteroides* (MASUDA et al., 2011), que apresenta amplo espectro microbiano.

A primeira cepa de *Leuconostoc mesenteroides* a ser relatada por produzir bacteriocina foi a *Leuconostoc mesenteroides* UL5 isolada de queijo cheddar, produz uma substância proteica com atividade antibacteriana, denominada mesenterocina 5. Esse composto antibacteriano foi pouco afetado após aquecimento por 30 min a 100 °C, indicando claramente que a substância ativa é uma proteína estável ao calor e demonstrou uma ação bacteriostática, mas não o efeito bactericida nas bactérias testadas em período de incubação de 18 h (DABA et al., 1991).

Mafiah et al. (1993) relataram a presença da bacteriocina mesenterocina Y105, produzida pela cepa *Leuconostoc mesenteroides* Y105, que é um peptídeo composto por 36

aminoácidos, possui massa molecular baixa, é altamente termoestável e possui um efeito bactericida sobre a cepa *Listeria monocytogenes* E20. Sua estrutura primária se assemelha ao de outras bacteriocinas como a leucocina A-UAL187, pediocina PA-1, sakacina P e curvacina A.

Mathieu et al. (1993) isolaram uma cepa de *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroide* FR 52 de leite de vaca cru e observaram a presença de uma bacteriocina denominada de Mesenterocina 52. Esta bacteriocina inibiu outras cepas de *Leuconostoc* e várias cepas de *Enterococcus* e *Listeria* spp. A mesenterocina 52 foi secretada para o meio durante a fase de crescimento, foi estável a pH 7, após aquecimento a 100 °C por 15 minutos, mas teve uma maior estabilidade a pH 4,5, após 6 horas de aquecimento a 80 °C. A massa molecular aparente foi estimada em menos de 10 kDa.

A bacteriocina mesenterocina 52 foi purificada das suas células produtoras por um método de adsorção dependendo do pH e dessorção da bacteriocina a partir de células produtoras, combinado com cromatografia líquida de alta performance de fase reversa. O perfil de eluição revelou a presença de dois picos inibitórios de atividade, cada um exibindo espectros inibitórios, denominados mesenterocina 52A e mesenterocinas 52B. A bacteriocina do pico 52A possuía um amplo espectro inibitório, incluindo a atividade antilisteria, possui uma massa molecular de 3868 Da e uma sequência de aminoácidos idêntica à descrita para Mesentericina Y105. A bacteriocina do pico 52B só foi ativa contra *Leuconostoc* sp., possui uma massa molecular de 3446 Da e sua sequência de aminoácido não tem homologia com nenhuma bacteriocina conhecida (REVOLL-JUNELLES et al., 1996).

A cepa *Leuconostoc mesenteroides* TA33a que produz três bacteriocinas diferentes as Leucocina A, Leucocina B e Leucocina C isoladas de carne processada foram estudadas e confirmadas que a Leucocina A se assemelha com leucocina sintética A-UAL 187 (FLEURY et al. 1996), por possuírem o mesmo tempo de retenção, mesma espectrometria de massa e mesmo espectro inibitório, portanto são o mesmo peptídeo antimicrobiano; a Leucocina B com peso molecular de 3466 Da apresenta semelhança com a mesenterocina 52B e dextransicina J24 ambos com peso moléculas de 3466 Da; a Leucocina C apresenta ser uma nova bacteriocina, pois possui um espectro antimicrobiano diferente, foi ativo a uma gama de bactérias gram positivas e teve um tempo de retenção diferente da leucocina sintética A-UAL 187 e mesenterocina Y105 (PAPATHANASOPOULOS et al., 1997).

A bacteriocina mesenterocina E131, que é ativa contra o agente patogénico *Listeria monocytogenes*, foi produzida pela cepa *Leuconostoc mesenteroides* E131, isolada da salsicha fermentada. Aplicando métodos moleculares, determinou-se que esta bacteriocina era idêntica à mesenterocina Y105 identificada anteriormente e era expressa durante a fase de crescimento exponencial (XIRAPHI et al., 2008).

A bacteriocina cíclica descoberta, produzida por *Leuconostoc mesenteroides* TK41401 foi a Leucociclina Q, isolada de pickles japoneses. Esta bacteriocina possui a sequência de aminoácidos semelhante à bacteriocina cíclica lactociclicina Q produzida por *Lactococcus* sp. QU 12, porém o espectro antimicrobiano diferiu claramente desta bacteriocina (MASUDA et al., 2011).

Outra bacteriocina descoberta, produzida por *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* IMAU: 10231, foi isolada da microbiota natural de uma salsicha Sremska, que é uma salsicha típica da Sérvia, essa bacteriocina apresentou uma atividade antilisterial, tendo um bom potencial de segurança de alimentos, podendo ser utilizada na indústria da carne, na produção da própria salsicha que foi isolada (MORACANIN et al., 2013).

Foram isoladas cepas de *Leuconostoc mesenteroides* de mussarela de búfalo, que foi caracterizada como *Leuc. Mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 e descobriu-se a presença de duas bacteriocinas Mesenterocina W-SJRP55 e Mesenterocina Z-SJRP55 com massas molares de 3.868 KDa e 3444 KDa, respectivamente. As sequências de aminoácidos indicaram homologia entre a bacteriocina Mesenterocina W-SJR55 e a Mesenterocina Y105; a Mesenterocina Z-SJRP55 e a mesenterocina B105, isoladas a partir de leite de cabra (PAULA et al., 2014).

3.7 Fatores que afetam o crescimento das bactérias lácticas e a produção de bacteriocinas

A produção de bacteriocinas ocorre durante a fase de crescimento das bactérias produtoras e acaba no final da fase exponencial ou, até mesmo, antes do fim do crescimento das BAL. A diminuição da produção de bacteriocinas pode ocorrer devido ao aumento populacional e à escassez de nutrientes (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). Como a produção de bacteriocinas é associada ao crescimento bacteriano, as suas taxas de produção devem melhorar em processos de fermentação contínua, no qual altas taxas de crescimento podem ser mantidas (PARENTE; RICCIARDI, 1999).

As BAL possuem uma capacidade limitada de sintetizar vitaminas B e aminoácidos, possuindo, portanto, necessidades nutricionais complexas para seu crescimento, por isso são comumente encontradas em ambientes ricos em nutrientes (HOFVENDAHL; HAGERDAL, 2000). Portanto, para que as BAL possam ter uma elevada produção de bacteriocinas, vários fatores têm que ser considerados como fontes de carbono, fontes de nitrogênio, pH, temperatura e agitação (CHEIG et al., 2002).

O controle do pH melhora o crescimento das BAL e, conseqüentemente, ocorre um aumento na produção de bacteriocinas, sendo que o pH ótimo para a produção é, geralmente, entre 5,5 e 6 (PARENTE; RICCIARDI, 1999). Liu et al. (2003) estudaram a produção de nisina utilizando como meio de cultura o soro de leite suplementado com hidrolisado de caseína em um reator de leite empacotado e também obtiveram a máxima produção de nisina em pH 5,5.

A temperatura é uma variável que interfere na produção de bacteriocinas, por isso estudos têm testados o máximo rendimento de produção desta bacteriocina na melhor condição. Liu et al. (2004) testaram a máxima produção de nisina em meio M17 em um intervalo de temperatura entre 25-38°C e concluíram que a melhor produção foi observada na temperatura de 31°C.

Em outro estudo em que se avaliou a produção de nisina por *Lactococcus lactis subsp. Laticis* utilizando como meio de cultura extrato fermentado de cevada que é um subproduto do Shochu (uma bebida destilada típica do Japão) foram testados diferentes valores de pH 5,2-6,0 e diferentes temperaturas 25-32°C. Foi observada uma produção máxima de nisina em pH 5,5, porém as mudanças de temperatura não afetaram acentuadamente a produção de nisina (FURUTA et al., 2008).

Hofvendahl e Hagerdal (2000) utilizaram as BAL para a produção fermentativa de ácido láctico (AL) e observaram que há um aumento da produção do ácido láctico quando um açúcar puro é fermentado. Esses autores relataram, também, que dentre as fontes de açúcar utilizadas a que obteve maior produção de AL foi a glicose. Para fontes de nitrogênio, observaram que a adição de maiores concentrações de nutrientes teve um efeito positivo sobre a produção AL, isto evidencia as exigências nutricionais complexas das BAL, devido a sua capacidade de biossíntese limitada.

Neysens et al. (2003) avaliaram o efeito do cloreto de sódio no crescimento e produção de bacteriocinas, e observaram que houve um efeito desvantajoso na adição do sal sobre a produção e a atividade das bacteriocinas por estirpes das BAL, porém, quando aplicado em concentrações baixas, o cloreto de sódio exerceu um efeito benéfico sobre a produção de bacteriocinas em algumas estirpes avaliadas.

Os tempos de fermentação para produção de bacteriocina são um fator determinante. Cheig et al. (2002) obtiveram máxima produção de bacteriocinas em 15 horas e término da produção em 30 h, já LosteinkiT et al. (2001) obtiveram máxima produção em 6 horas e, em 35 h, já não havia mais produção de bacteriocinas.

3.8 Considerações Finais

As bacteriocinas têm sido amplamente utilizadas como conservante natural de alimentos, devido à demanda cada vez maior do mercado mundial por alimentos naturais e saudáveis. Assim, é importante o desenvolvimento de tecnologias para a conservação de alimentos empregando agentes antimicrobianos naturais como, por exemplo, as bacteriocinas. Pesquisas sobre novas fontes de bacteriocinas são de grande importância para atender ao mercado alimentício.

Existem vários fatores que influenciam no crescimento das BAL e, conseqüentemente, na formação de bacteriocinas, tais como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH, temperatura, agitação dentre outros. Portanto, é necessária a otimização das condições de processo para que a água residuária de fecularia possa ser utilizada como substrato para a produção de bacteriocinas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos resíduos

Os resíduos das agroindústrias de processamento de mandioca para o isolamento das bactérias lácticas foram coletados em uma única coleta das indústrias de fécula de mandioca da região Oeste do Estado do Paraná e em indústria de produção de farinha de mandioca do Estado de São Paulo.

Nos ensaios de produção de bacteriocinas foram utilizados como substrato a água residuária do processo de obtenção da fécula de mandioca. Na execução do trabalho foram realizadas duas coletas de efluente em fecularia da região Oeste do Estado do Paraná.

4.2 Caracterização físico-química dos resíduos utilizados como substrato para a produção de bacteriocinas

Após a coleta e homogeneização da água residuária da fecularia de mandioca, foram retiradas amostras para a caracterização físico-química em função dos seguintes parâmetros: pH, DQO, sólidos totais, sólidos totais voláteis e açúcares totais. Na determinação dos parâmetros foram utilizados métodos descritos em APHA (2005), com exceção dos açúcares totais que foram determinados de acordo com os indicadores descritos em Dubois et al. (1956).

Na Tabela 3, encontram-se os dados relativos à composição da água residuária da indústria de fécula de mandioca utilizada como meio de cultura para a produção de bacteriocinas.

Tabela 3 Composição da água residuária da indústria da fécula de mandioca utilizada como substrato para a produção de bacteriocina

Parâmetros	Unidades	Água residuária
Potássio	mg/L	685,62
Magnésio	mg/L	90,04
Carbono total	mg/L	4720
Nitrogênio total	mg/L	290
Açúcares totais	mg/L	6,19
DQO	mg/L	17600
pH	-	3,92
Ácido láctico	mg/L	230
Ácido acético	mg/L	47,22

4.3 Obtenção de bactérias do ácido láctico (bal) produtoras de bacteriocinas

4.3.1 Isolamento das bactérias do ácido láctico de resíduos do processamento da mandioca

Para o isolamento das bactérias do ácido láctico de resíduos do processamento da mandioca foi utilizada a metodologia adaptada de Jatobá et al. (2008), Coelho (2011) e Bernardo et al. (2013).

Foram utilizados os efluentes dos processos da extração da fécula e da fabricação da farinha. Inicialmente, foi preparado o meio de cultura M17 (caldo), com a seguinte composição (g/L): peptona de caseína (2,5); peptona de carne (2,5); peptona de soja (5); extrato de levedura (2,5); extrato de carne (2,5); β glicerofosfato dissódico penta hidratado (19), sulfato de magnésio hidratado (0,25); ácido ascórbico (0,5). O caldo M17 foi então inoculado com o resíduo líquido do processamento da mandioca, na proporção de 2 mL do resíduo em 18 ml do meio M17 e incubado a 35°C, 150 rpm por 24 horas.

Após esse período, foram retirados 100 μ L do caldo fermentado e colocados em Eppendorff contendo 900 μ L de água peptonada tamponada, realizando diluições em série de fator 10 até 10⁻⁶. De cada diluição, foram utilizados 100 μ L para o plaqueamento pela técnica *Pour Plate* em meio de cultura ágar M17, levando para a incubação a 35°C por 48 horas.

A partir destas placas, foram selecionadas, aleatoriamente, as colônias que estavam com a sua morfologia bem formada, com as características de colônias brancas leitosas e circulares; foram purificadas pelo método de esgotamento por estria, em placas de Petri

contendo meio M17 sólido. As placas foram então incubadas novamente a 35°C por 48 horas para a obtenção dos isolados de bactérias do ácido lático.

Após a obtenção dos isolados, eles foram caracterizados segundo sua morfologia e características bioquímicas, pela coloração de gram e produção de catalase; foram conservados como culturas estoque a -20°C em caldo M17, contendo 30% (v/v) de glicerol, para posterior preparação do inóculo e fermentação.

4.3.2 Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados

As colônias isoladas foram submetidas à caracterização morfológica e bioquímica, através da coloração de gram e produção de catalase. A coloração de gram foi realizada através do tratamento de células devidamente fixadas em lâminas de vidro com cristal violeta, lugol, álcool e fucsina e visualizadas em microscópio óptico, com objetiva de 100x e ocular de 10x. O teste da catalase foi realizado adicionando uma gota de peróxido de hidrogênio à superfície das culturas cultivadas em Ágar M17. Ocorrendo o borbulhamento imediato da cultura, considerava-se como catalase positiva, na ausência de borbulhamento como catalase negativa.

As colônias com características de coco ou bacilo gram positivos e catalase negativa foram consideradas BAL potencialmente produtoras de bacteriocinas (CAMARGO, 2011; KRUGER et al., 2013). As colônias com potencial para a produção de bacteriocinas foram selecionadas e então avaliadas quanto a sua produção.

4.4 Otimização da produção de bacteriocinas em água residuária da indústria de fécula de mandioca

Para identificar as variáveis que teriam efeito significativo na produção de bacteriocinas foi utilizado o planejamento experimental Plackett Burman (PB). Este planejamento tem sido muito utilizado para identificar variáveis significativas de um maior número de variáveis potenciais, com menor número de ensaios (GREASHAM; HERBER 1997). O PB utilizado contemplou cinco variáveis independentes (pH, sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio e sulfato de magnésio), com dois níveis e três repetições no ponto central. As variáveis independentes com seus respectivos níveis foram selecionadas com base na revisão da literatura, como fatores que influenciam na produção de bacteriocinas (AMIALI et al., 1998; CABO; MURADO; GONZALEZ, 2001; CHANDRAPATI;

SULLIVAN, 1998; CHEIG et al., 2002; DABA et al., 1993; DROSINOS et al., 2006; GUERRA; RUA; PASTRANA, 2001; LIU et al., 2004; LOSTEINKIT et al., 2001; PARENTE; RICCIARDI, 1999; PONGTHARANGKUL; DEMIRCI, 2006; SIMSEK et al., 2009). Na Tabela 4 são apresentados os dados relativos aos níveis das variáveis independentes do planejamento PB.

Tabela 4 Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental fatorial Plackett Burman para a produção de bacteriocinas

Variável	Níveis		
	-1	0	+1
pH	5,5	6	6,5
Sacarose (g/L)	0	10	20
Extrato de Levedura (g/L)	0	5	10
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0	0,57	1,14
MgSO ₄ (g/L)	0	0,57	1,14

Os dados sobre as condições do modelo experimental Plackett Burman, com 12 ensaios e 3 repetições no ponto central estão relacionadas na Tabela 5.

Tabela 5 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental Plackett Burman com quatro repetições no ponto central para a produção de bacteriocinas

Experimentos	pH	Sacarose	Extrato de levedura	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄
1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1
4	1	-1	1	1	-1
5	1	1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0

A variável resposta avaliada foi concentração de bacteriocinas. Os resultados foram avaliados pela análise estatística dos efeitos no *software* Statistica® 8.0.

A fórmula que representa o modelo está apresentada na Equação 1.

$$E(x_i) = \frac{2(\sum Mi^+ - Mi^-)}{N} \quad (1)$$

em que:

$E(x_i)$ = Efeito da variável testada;

Mi^+ e Mi^- = Respostas dos ensaios para os níveis (+1 e -1);

N = Número total de ensaios.

A fórmula que explica o erro padrão experimental está apresentada na Equação 2.

$$SE = \sqrt{\frac{\sum (E x_i)^2}{N}} \quad (2)$$

em que:

S = Erro padrão experimental;

$E(x_i)$ = Efeito da variável testada;

N = Número total de ensaios.

A significância (p-valor) do efeito de cada variável na produção de bacteriocinas foi medida pelo teste t de Student, apresentado na Equação 3.

$$t(x_i) = \frac{E(x_i)}{SE} \quad (\text{eq.3})$$

em que:

$E(x_i)$ = Efeito do variável testada;

SE = Erro padrão experimental.

Identificadas as variáveis com maior influência na produção de bacteriocinas, foi realizado o experimento delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimizar a produção de bacteriocinas. As variáveis independentes selecionadas do PB foram sacarose, extrato de levedura e sulfato de magnésio. No DCCR, utilizou-se planejamento fatorial 2^3 com oito ensaios nos níveis -1 e +1, seis ensaios na parte axial $-\alpha$ e $+\alpha$ e três repetições no ponto central, obtendo-se 17 ensaios. Na Tabela 6 são apresentados os dados relativos aos níveis do planejamento com os respectivos valores das variáveis independentes do DCCR.

Tabela 6 Variáveis independentes e níveis do planejamento composto central rotacional (DCCR)

Variável	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Sacarose (g/L)	0	6,0714	15	23,9285	30
Extrato de Levedura (g/L)	5	7,0238	10	12,9762	15
MgSO ₄ (g/L)	0	0,30357	0,75	1,19642	1,5

As condições experimentais referentes ao modelo experimental planejamento composto central rotacional (DCCR), com 14 ensaios e 3 repetições no ponto central estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental composto rotacional (DCCR) com três repetições no ponto central

Experimentos	Sacarose	Extrato de Levedura	MgSO ₄
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	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

O DCCR ajusta um modelo teórico não linear às respostas obtidas nos experimentos do planejamento. O ajuste segue um modelo de 2^o ordem e é descrito pela Equação 4.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} X_i X_j + E \quad (4)$$

em que:

Y = resposta predita de produção de bacteriocina;

β_0 = valor constante do intercepto;

β_i = coeficiente lineares;

x_i = os parâmetro variáveis;

β_{ii} = coeficiente quadrático de x_i ;

β_{ij} = coeficiente da interação entre a variável x_i .

Com o auxílio de *software* STATISTICA, a análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar a importância do modelo e coeficientes de regressão. A qualidade da equação polinomial foi julgada pelo coeficiente de determinação (R^2) e a significância estatística foi verificada por teste-F de Fischer. A significância do coeficiente de regressão foi testado pelo teste t de Student. A superfície de resposta e a resposta de contorno do

modelo-predito foram utilizadas para avaliar as relações interativas entre as variáveis significativas.

Para estimar as melhores respostas de produção de bacteriocinas foi utilizada a função *desirability* de Derringer. Segundo Derringer e Suich (1980), a função *desirability* tem como objetivo encontrar as condições de operação que garantam o cumprimento dos critérios para todas as respostas envolvidas e, ao mesmo tempo, proporcionar a melhor resposta conjunta dos fatores estudados.

Após a realização dos ensaios do DCCR, foram determinadas as melhores condições para a produção de bacteriocinas. Além disso, foram calculados os coeficientes de regressão, a análise de variância (ANOVA) e obtidos os gráficos de superfícies de resposta, para o intervalo de confiança de 90%. Em busca de determinar a validade dos resultados foram realizados ensaios com os parâmetros selecionados no delineamento experimental DCCR, bem como a cinética de produção de bacteriocinas em função do tempo de fermentação.

Para a realização dos delineamentos experimentais PB e posteriormente o DCCR, foi preparado o inóculo utilizando a cultura estoque do item 4.3.1, que foi ativada em caldo *Man Rogosa and Sharpe* (MRS), com a seguinte composição (g/L): glicose (20,0), peptona (10,0), extrato de levedura (5,0), extrato de carne (10,0), acetato de sódio (5,0), citrato de amônio (2,0), K_2HPO_4 (5,0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1) e $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0,05). O inóculo foi incubado a 30°C, 100 rpm, por 16 horas ou até a obtenção de densidade óptica 1 a 660 nm.

Para a realização das fermentações dos delineamentos experimentais PB e DCCR os ensaios foram conduzidos em frascos de 120 mL, contendo 45 mL de água residuária da indústria de mandioca enriquecida com os fatores, segundo os planejamentos experimentais PB e DCCR. O pH foi ajustado para 6 com NaOH 0,2 mol/L e os frascos foram autoclavados a 121 atm por 15 min. Após o resfriamento do material, foi adicionado o inóculo 10% v/v e incubado a 35°C, 100 rpm, por 36 h.

Após esse período foram medidos os valores de pH dos meios fermentados e então promovida a acidificação com HCl 0,2 mol/L até pH 2,5, com o objetivo de assegurar a excreção total das bacteriocinas das células para o meio extracelular. O meio acidificado foi centrifugado a 3.200 rpm por 20 min, o sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro de 0,20 μ para posterior quantificação de bacteriocinas (JOZALA et al., 2005). No sobrenadante foram analisados também os parâmetros DQO, açúcares totais, ácido lático e ácido acético. O precipitado da centrifugação foi utilizado para a quantificação da biomassa, expressa como sólidos suspensos totais (SST).

4.5 Identificação molecular do isolado

Após os ensaios de produção de bacteriocinas selecionou-se a cepa com maior potencial de produção, identificada por sequenciamento genético. A região variável v3-v4 do gene ribossomal 16s foi amplificada por PCR para o sequenciamento de amplicons 16s rRNA, e sequenciadas por meio da plataforma Illumina MiSeq, realizada pela empresa Neopropecta.

4.6 Métodos analíticos

As medidas de pH foram realizadas em pHmetro de bancada Tec 3MP da marca Tecnal®. A demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (SV) foram determinados pelos métodos preconizados pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (EATON et al., 2005). A concentração de açúcares totais (AT) foi quantificada de acordo com a descrita por de Dubois et al. (1956).

Os ácidos láctico e acético foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema Shimadzu®, equipado com coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm Bio-Rad), forno CTO20A à temperatura de 64 °C, controlador CBM-20A, detector UV com arranjo de diodos SPD20A em comprimento de onda de 208 nm e bomba LC-20AT. A fase móvel foi composta por água ultrapura Milli-Q (Millipore®), acidificada com 0,005 M de H₂SO₄, em fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL (LAZARO et al., 2012; PENTEADO et al., 2013). As amostras para a análise dos ácidos foram filtradas em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 µm e acidificadas com solução de H₂SO₄ (2 Mol/L).

4.7 Determinação da atividade de bacteriocinas

A atividade de bacteriocinae foi determinada pelo método de difusão em ágar, descrito por Lewus e Montivelle (1991). Nesse método, placas de Petri com o meio TSA (Ágar triptona de soja) suplementado com sangue de carneiro (5% v/v) são inoculadas com o microrganismo indicador *Lactococcus sakei*, sensível à ação da bacteriocina.

O cultivo do microrganismo indicador *Lactococcus sakei* foi realizado em meio líquido MRS 35°C, 100 rpm, até atingir densidade óptica de 0,4 (660 nm); 100 µl da cultura foi então

espalhado com o auxílio da alça de Drigalski na placa de Petri, contendo meio TSA suplementado com sangue de carneiro. Com a ajuda de um perfurador de metal estéril, pocinhos de 3 mm foram cortados. Alíquotas de 20 µl do sobrenadante das amostras fermentadas foram colocadas em cada pocinho. As placas foram incubadas em jarro de anaerobiose a 35°C por 24 h.

O diâmetro dos halos formados (por inibição do crescimento celular) foi medido com o auxílio de um paquímetro, sendo realizadas 4 medidas dos halos. A medida média dos halos foi relacionada com a atividade de bacteriocina, a qual é expressa em Unidades arbitrárias (AU).

Para a quantificação da concentração de bacteriocinas, foi confeccionada uma curva padrão, relacionando a concentração da bacteriocina nisina com o diâmetro do halo de inibição. Para isso, utilizou-se um padrão comercial de nisina da Sigma Aldrich contendo 2,5% de nisina, correspondendo 10⁶ de AU. A curva padrão foi obtida por meio de diluições da nisina padrão em água residuária da mandioca autoclavada a 121 atm por 15 min, nas concentrações de 10⁰ a 10⁵ AU/mL.

A curva padrão obtida a partir da nisina dissolvida em água residuária da indústria de mandioca e a relação dos diâmetros do halo de inibição gerou uma equação da reta, descrita pela Equação 5.

$$PB = \log_{10}^{(0,1502x-0,2834)} \quad (5)$$

em que:

PB = produção de bacteriocina (AU/mL);

x = medida do halo de inibição (mm).

4.8 Determinação de bacteriocinas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)

Para a determinação de bacteriocinas realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS), foi utilizado um equipamento da Agilent 1200 Series, autosampler 1200 Series, detector DAD 1260, bomba quaternária 1200, e forno para coluna 1200 Series.

A coluna utilizada foi a Phenomenex Gemini – NX C18 (50 x 4.6mm) 3 µm. O tempo de análise foi de 25 min, com um volume de injeção de 50µL, fluxo de 0.3 mL/min e temperatura da coluna 30°C. A fase móvel foi composta por água ultrapura Milli-Q e Acetonitrila (ACN) ambos com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente utilizado variou a

concentração de ACN: 0.1 – 3.1 min (5% ACN), 3.1 – 15.0 min (5 – 65% ACN), 15.0 – 18.0 min (65 - 100% ACN), 18.0 – 20.0 min (100% ACN) e restabeleceram-se as condições iniciais por mais 5.0 min.

As condições do espectrômetro de massas 3200 QTRAP (quadrupolo – ion trap linear), AB SCIex foram as seguintes: ionização por electrospray (Turbo ion spray) no modo positivo, com os seguintes parâmetros: ion spray: 5500 V, curtain gas: 25 psi, temperatura: 650°C, gas 1: 50 psi, gas 2: 50 psi, interface heater: ON, DP (*Declustering potential*) 55.0 V, EP (*Entrance potential*) 10.0 V. Para os experimentos de MRM (*Multiple reaction monitoring*) para investigação de nisina A utilizaram-se os parâmetros listados na Tabela 8.

Tabela 8 Parâmetros utilizados para o experimento de MRM

Composto	Massa Molecular (Da)	Ion precursor (<i>m/z</i>) e estado de ionização	Ion fragmento (<i>m/z</i>)	CE (V)
Nisina A	3354.1	671 (5+)	811	25
		671 (5+)	216	25
		671 (5+)	197	25
		839 (4+)	266	45
		839 (4+)	1081	45
		839 (4+)	216	45

Para os experimentos de verificação de presença das nisinas Z e A nas amostras, foram realizados experimentos de EPI (*Enhanced product ion*) com energia de colisão de 35.0 V (\pm 15.0 V) e velocidade de varredura de 4000 Da/s.

4.9 Determinação da produção de bacteriocinas em reator em bateladas sequenciais

Definidas as condições otimizadas para os fatores do DCCR, foram realizados ensaios em reator em bateladas sequenciais para testar a produção de bacteriocinas em escala maior.

A operação do sistema foi realizada de acordo com os ciclos típicos da batelada sequencial: (i) alimentação (20 min), em que o reator é carregado com o substrato nas condições otimizadas no DCCR, iniciando-se simultaneamente a agitação; (ii) reação (15 h), período em que ocorre a produção de bacteriocinas; (iii) sedimentação/descarga (20 min), ao término do ciclo, o líquido é descarregado do reator em 20 min, iniciando-se em seguida um novo ciclo. A operação do reator foi dividida em duas condições de substrato: i) água

residuária otimizada segundo o DCCR autoclavada (121°C/ 15 min); ii) água residuária otimizada segundo o DCCR sem autoclavar.

O reator operado em bateladas sequenciais utilizado no experimento foi confeccionado em *pexiglass* transparente com 5 mm de espessura, 30 cm de altura, 20 cm de diâmetro, capacidade total de 6 L e capacidade útil de 4 L (2 L de volume residual e 2 L de volume alimentado por ciclo (Figura 2). Para a manutenção da temperatura o reator foi colocado em uma câmara com temperatura controlada (30°C).

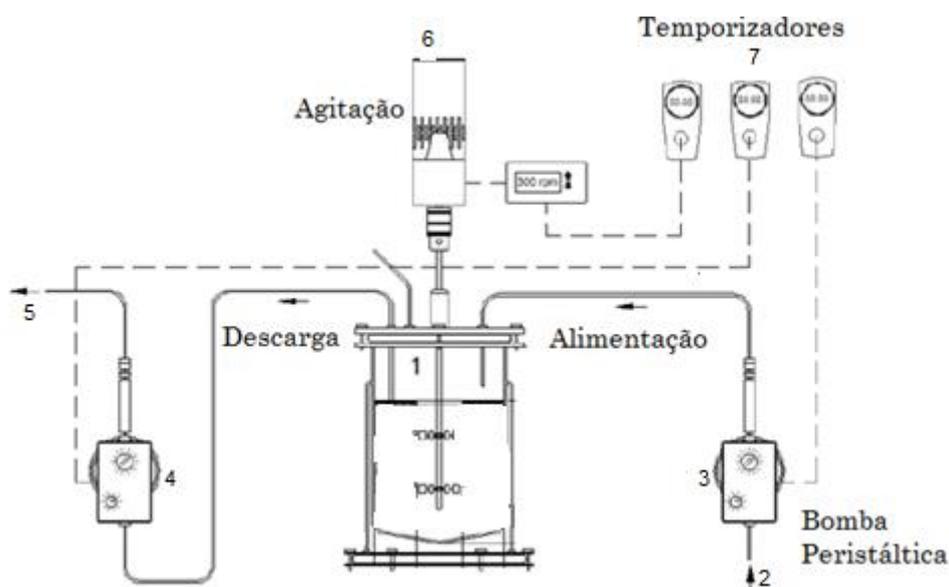


Figura 2 Reator operado em bateladas sequenciais (MANSSOURI, 2012) 1. Reator em Pexiglass; 2. Entrada afluyente; 3. Bomba peristáltica dosadora entrada; 4. Bomba peristáltica dosadora de descarga; 5. Saída efluente; 6. Sistema de agitação; 7. Sistema de automação.

Fontes: Manssour (2012) e Inoue (2013).

Para garantir a agitação fixa foram utilizados impelidores do tipo turbina com 6 cm de diâmetro, com 6 lâminas planas instaladas a 8 e 16 cm do fundo do tanque para garantir a agitação fixa de 100 rpm. As etapas de alimentação e descarga foram realizadas por bombas peristálticas dosadoras da marca Milan[®]. A autonomia do processo foi garantida pelo uso de temporizadores digitais (TH-857 Plus Kienzle[®]), responsáveis pelo acionamento/parada das bombas e do sistema de agitação, conduzindo à realização das etapas da operação em bateladas sequenciais: alimentação, agitação, decantação e descarga.

O reator foi monitorado, de forma que, a cada 15 h, foram realizadas as coletas de amostras do efluente para determinação da produção de bacteriocinas, biomassa celular, pH, DQO e açúcares totais. O reator foi conduzido em duas condições: na condição (i) foi conduzido por 13 ciclos e na condição (ii) foi conduzido por 6 ciclos, em ambos os ciclos o objetivo foi observar o comportamento da produção de bacteriocinas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação das cepas de BAL isoladas de resíduos do processamento de mandioca

Gomes et al. (2016) relataram ter encontrado a presença da bacteriocina nisina em água residuária da indústria processadora da farinha de mandioca. Como a nisina é uma bacteriocina amplamente utilizada como conservante alimentar por ser considerada segura, e por ser a única bacteriocina produzida comercialmente, procurou-se isolar o microrganismo produtor de nisina *Lactococcus lactis* de água residuária de indústria processadora de mandioca.

Das colônias inicialmente isoladas das amostras de efluentes líquidos das indústrias de fécula e farinha de mandioca em ágar M-17, uma foi caracterizada como bactéria do ácido láctico com potencial de produção de bacteriocina. Esse isolado apresentou forma branca leitosa e circular (Figura 3a), morfologia coco gram positivo (Figura 3b), com reação de catalase negativa e inibição no crescimento de *Lactococcus sakei* em teste de antagonismo (Figura 4), sendo o mesmo selecionado para dar continuidade ao trabalho.

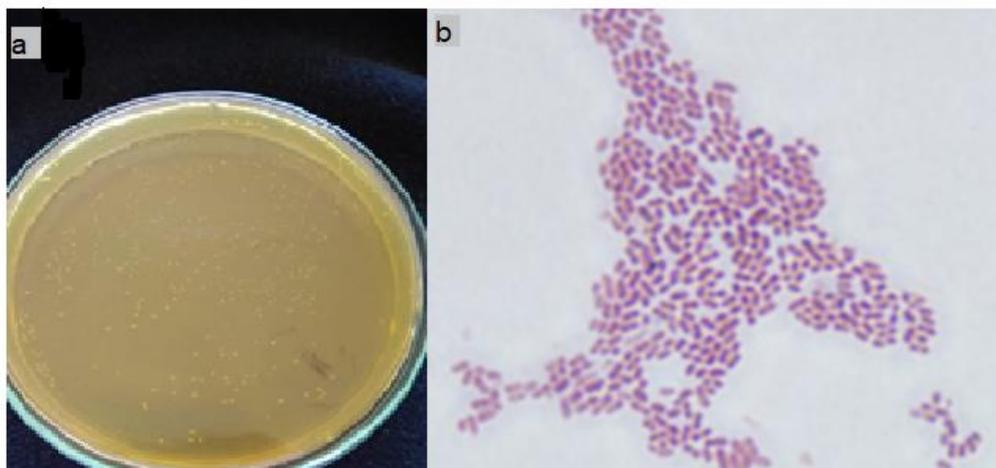


Figura 3 Bactéria isolada em ágar M-17: a) forma branca leitosa e circular; b) cocos gram positivos.

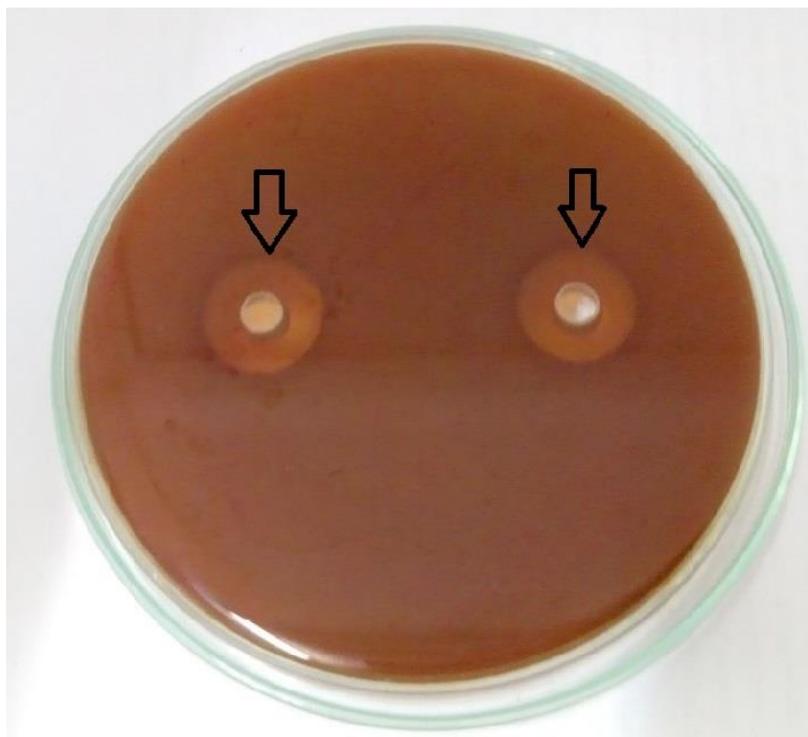


Figura 4 Teste de antagonismo com formação do halo de inibição do crescimento de *Lactococcus sakei*.

Para verificar se a bacteriocina produzida pelo isolado obtido se tratava de nisina, os substratos fermentados no delineamento PB foram analisados no equipamento LC-Ms/Ms. Para tanto, utilizou-se o padrão de nisina A de *Lactococcus lactis* 2,5% da Sigma Aldrich. No gráfico da Figura 5, podem ser observados o cromatograma de íons totais (TIC), o cromatograma de íons extraídos (XIC) m/z 671 ($[M+5H]^{5+}$) e o respectivo espectro de massas da banda detectada em 11,05 min da amostra de padrão comercial de nisina A.

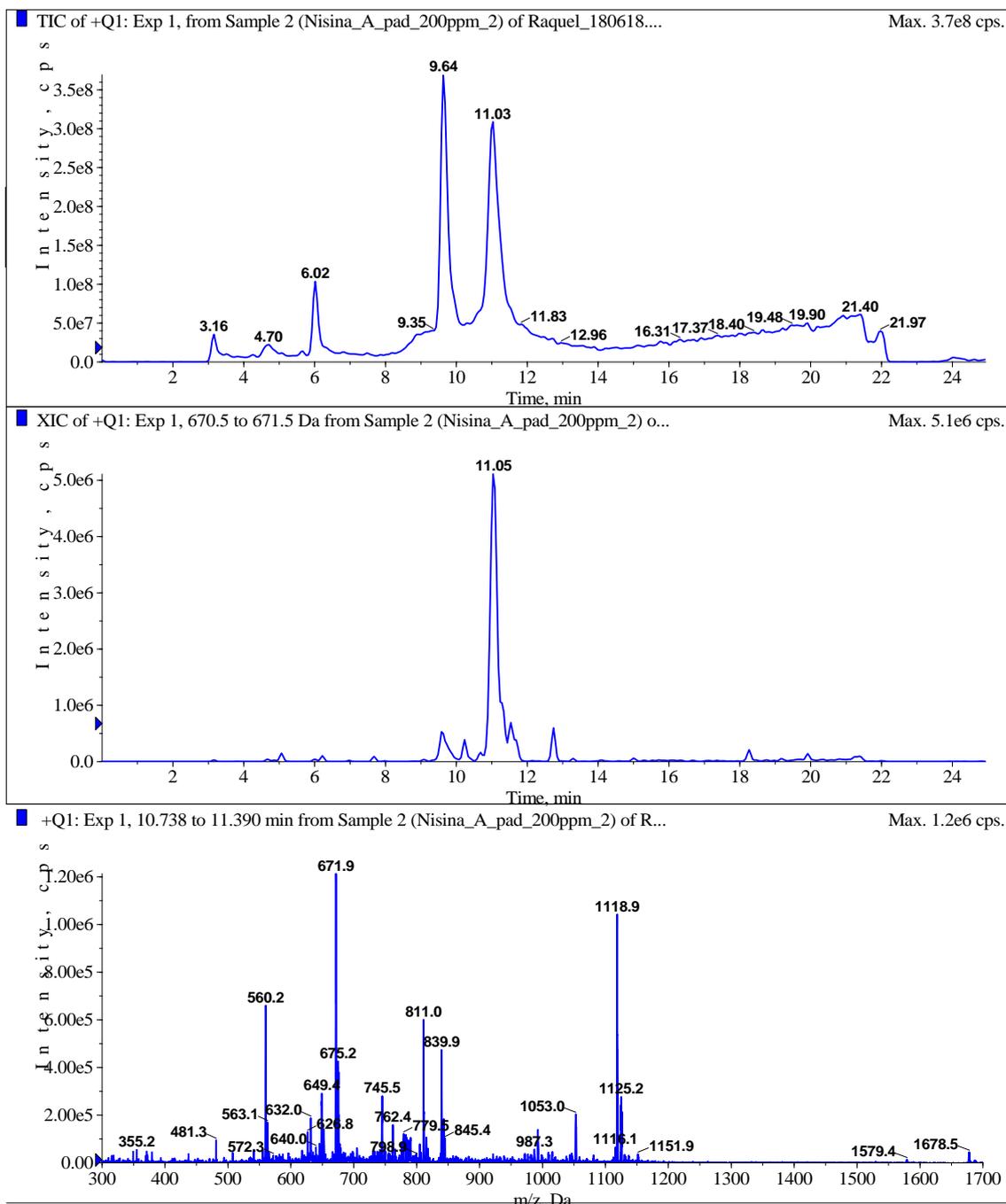


Figura 5 Cromatograma de íons totais (TIC), cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 671 ($[M+5H]^{5+}$) e respectivo espectro de massas da banda detectada em 11,05 min da amostra de padrão comercial de nisina A.

O espectro de massas obtido para o tempo de retenção de 11 minutos comprova a presença de nisina A, pois todas as formas de ionização da mesma foram identificadas: 1678 $[M+2H]^{2+}$, 1119 $[M+3H]^{3+}$, 839 $[M+4H]^{4+}$ e 671 $[M+5H]^{5+}$ (Figura 5).

As massas obtidas para a nisina A estão de acordo com aquelas apresentadas por Schneider, Werkmeister e Pischetsrieder (2011).

Com a finalidade de obter um método bastante sensível para a detecção de nisina A nas amostras e sua posterior quantificação, foram realizados experimentos de íons

fragmentos para os íons referentes à nisina A com diferentes energias de colisão (15,0, 25,0, 30,0, e 45,0 V). Nos gráficos das Figuras 6 e 7 podem ser visualizados os espectros de íons fragmentos de m/z 1678, 1119, 839 e 671 com energia de colisão de 25,0 V e 45,0 V, respectivamente.

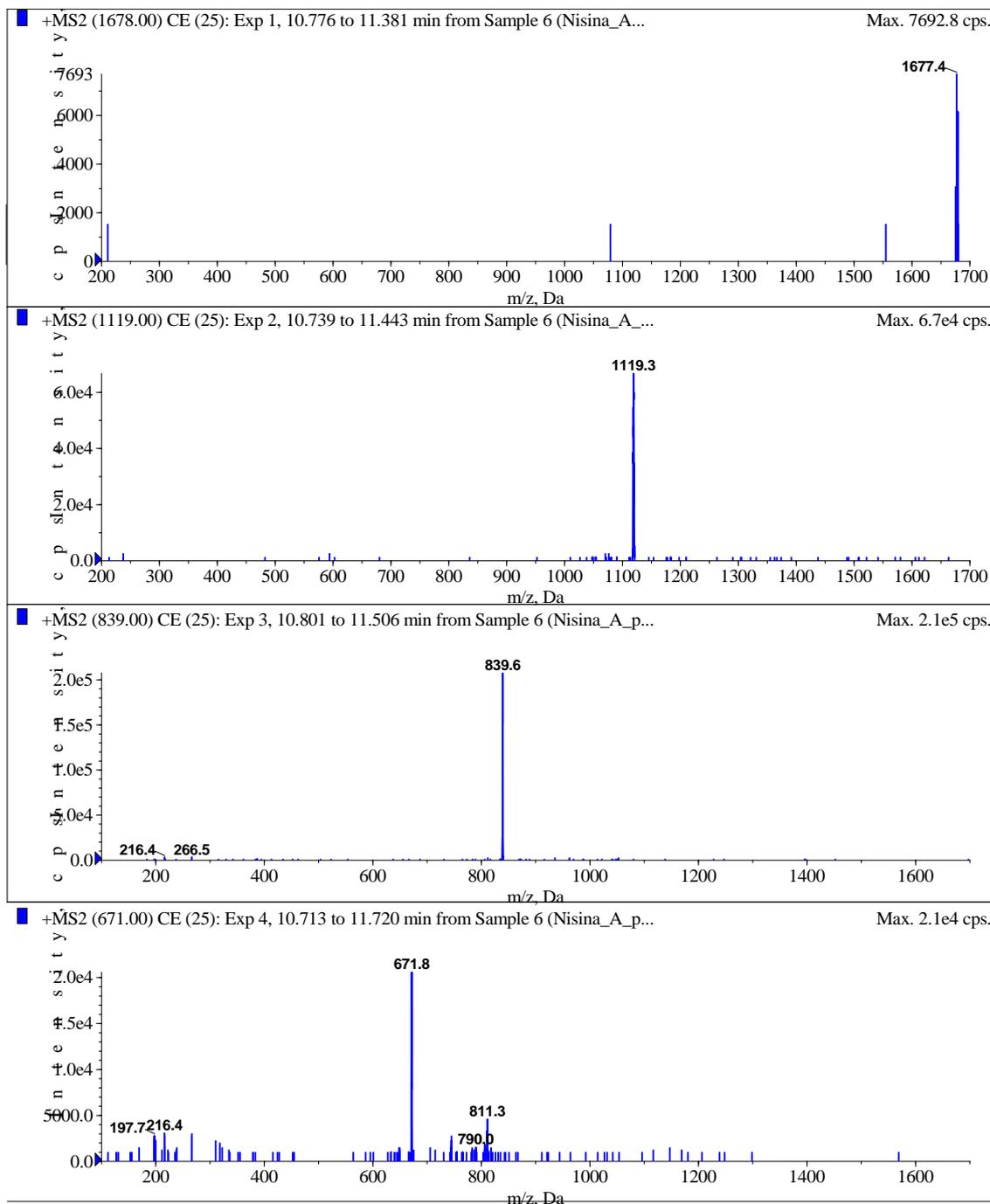


Figura 6 Espectros de íons fragmentos de m/z 1678, 1119, 839 e 671 com energia de colisão de 25.0 V, respectivamente.

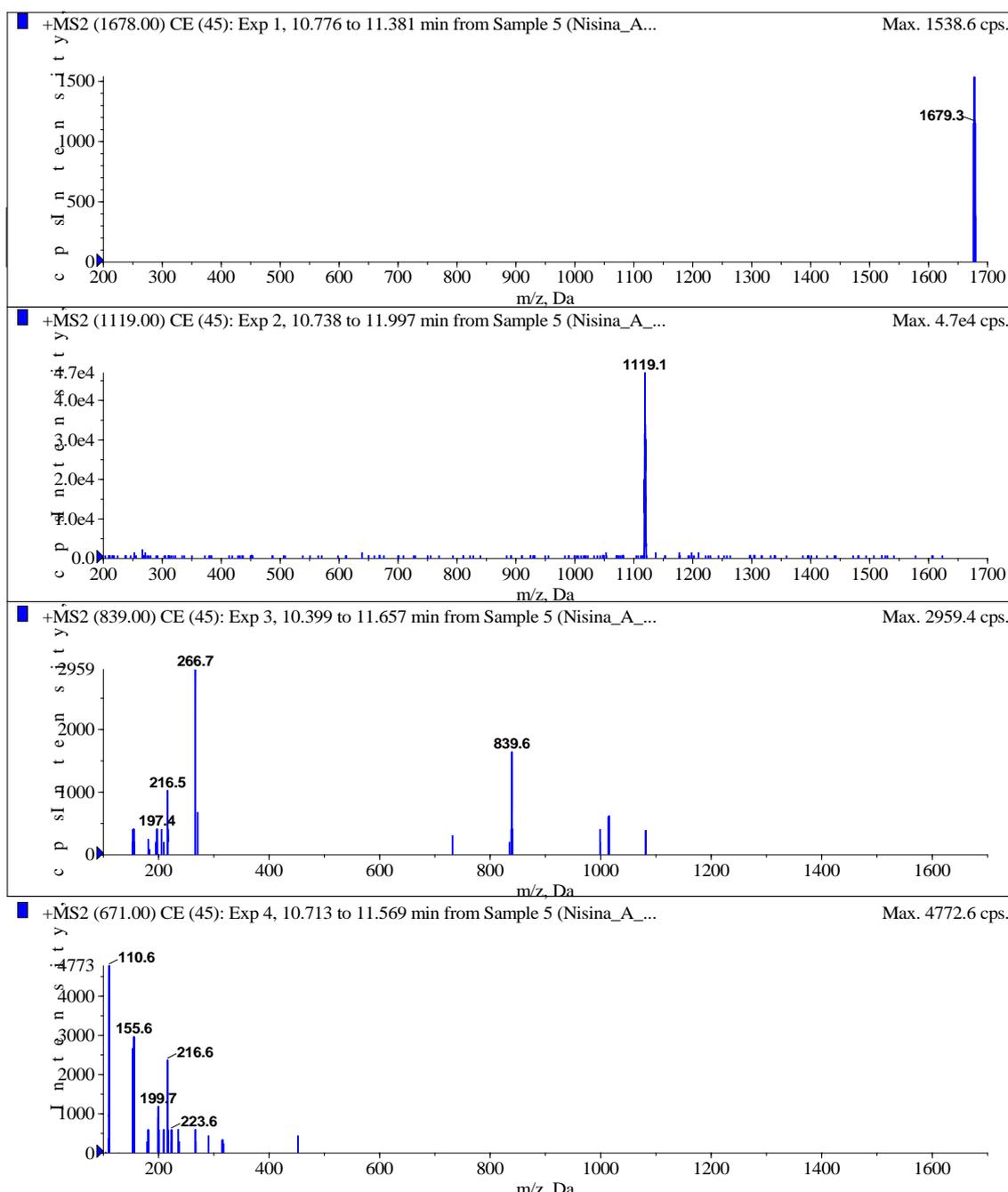


Figura 7 Espectros de íons fragmentos de m/z 1678, 1119, 839 e 671 com energia de colisão de 45.0 V, respectivamente.

Os experimentos de íons fragmentos mostraram que os melhores íons que podem caracterizar informações sobre a nisina A são os íons m/z 671 e 839, pois geram íons fragmentos que podem ser monitorados. Já os demais íons de maiores valores (m/z 1678 e 1119) não apresentaram íons fragmentos, nem em energias de colisão mais elevadas.

No gráfico apresentado na Figura 8, a nisina A é facilmente detectada por esse modo de análise. O XIC (cromatograma com bandas coloridas) indicam todas as transições avaliadas e seguem como o esperado, ou seja, todas as transições devem ter o mesmo tempo de retenção.

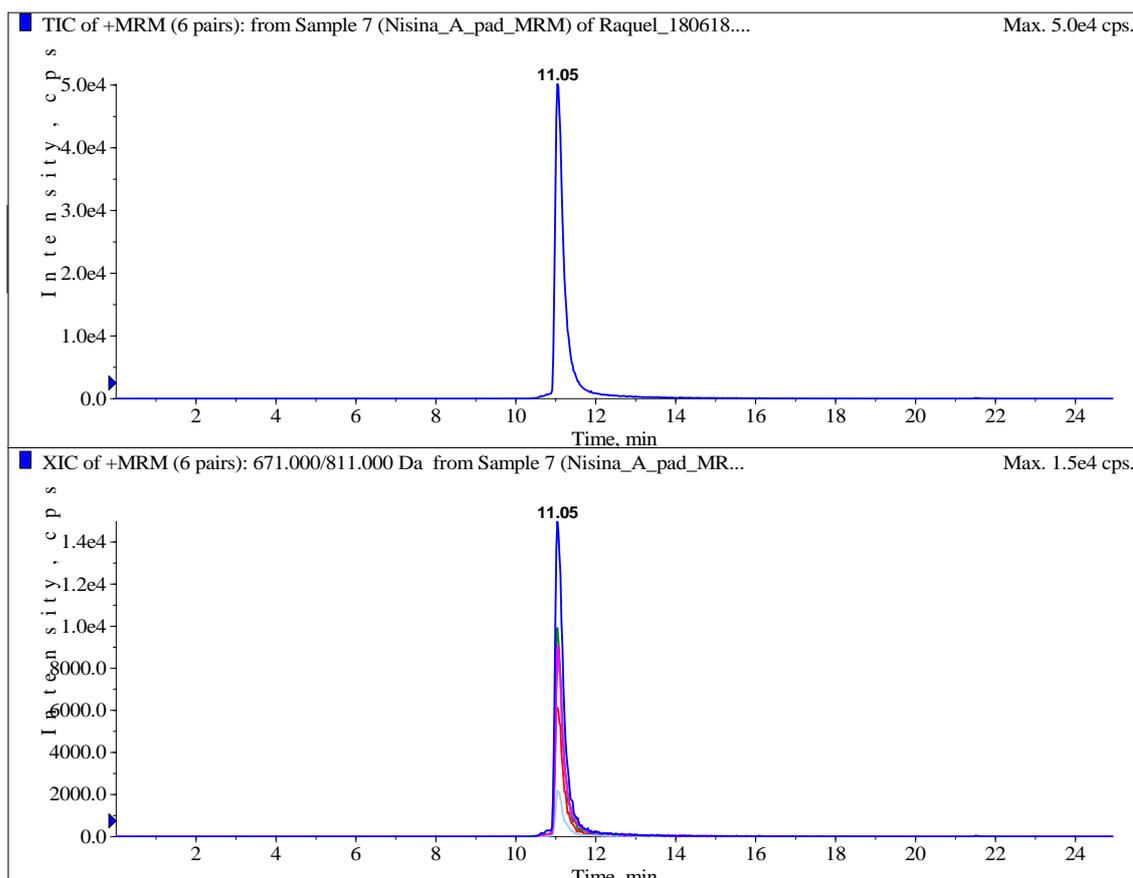


Figura 8 TIC (MRM) para nisina A e XIC para as transições 671>811, 671>216, 671>197, 839>266, 839>1081 e 839>216, respectivamente.

Definidos os procedimentos da análise de nisina A no LC-Ms/Ms, iniciaram-se as análises das amostras de água residuária de indústria de fécula de mandioca fermentada nos ensaios do delineamento experimental Plackett Burman (PB) e também com o meio sintético MRS. Na Figura 9 são visualizados os gráficos referentes aos cromatogramas de íons extraídos e os espectros de massa de íons extraídos para o ensaio 16 do PB, os demais ensaios apresentaram espectros de massa similares, por isso não serão apresentados.

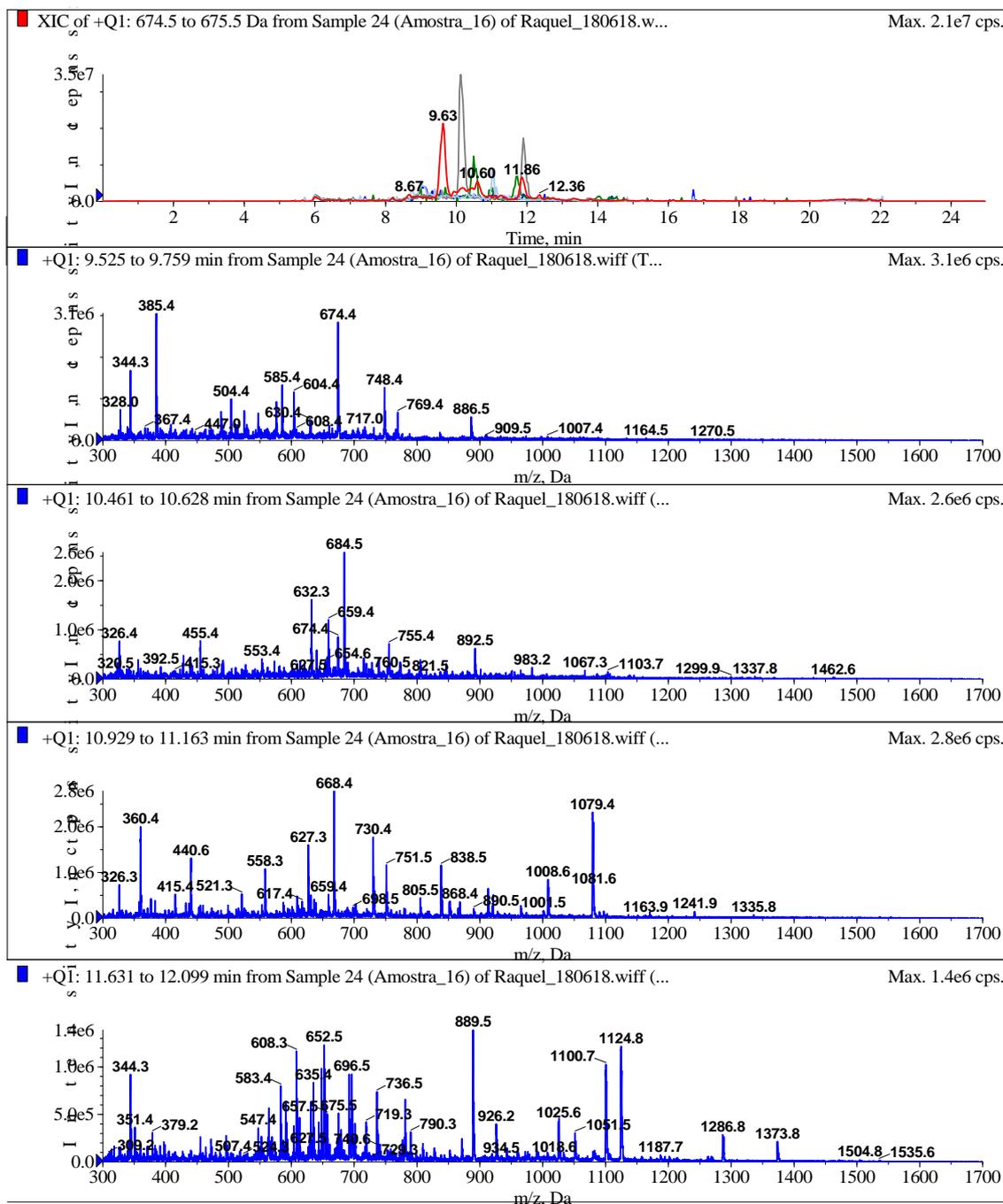


Figura 9 Ensaio 16 do PB: XIC de m/z 671, 675, 632, 635, 670, 784, 652 e espectros de massas das bandas em 9,5, 10,1, 10,5, 11,1 e 11,6 min, respectivamente.

Na Figura 10 podem ser observados o cromatograma de íons extraídos e os espectros de massa de íons extraídos para fermentação realizada com meio sintético MRS.

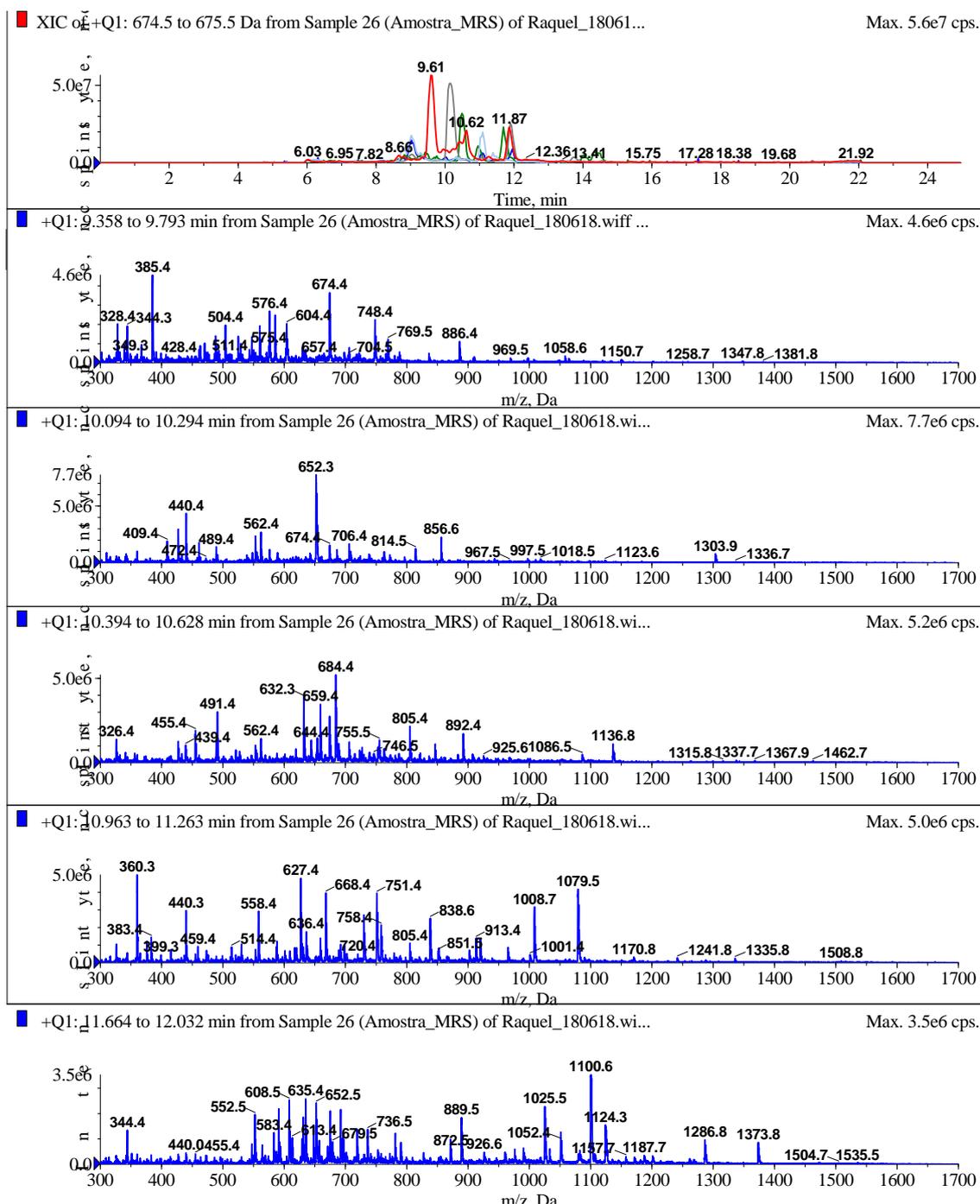


Figura 10 Amostra de meio sintético MRS fermentado: XIC de m/z 671, 675, 632, 635, 670, 784, 652 e espectros de massas das bandas em 9,5, 10,1, 10,5, 11,1 e 11,6 min, respectivamente.

Nas Figuras 9 e 10 são observados os mesmos perfis cromatográficos, da mesma forma que se dá também para as demais amostras (dados não mostrados), porém não é possível ser identificado a bacteriocina nisina, pois os espectros de massa no mesmo tempo de retenção de 11 minutos não apresentam as mesmas formas de ionização que ocorre no padrão comercial (Figura 5), indicando que provavelmente se trata de outro peptídeo.

Realizaram-se ainda experimentos de íons fragmentos para os íons citados na Figura 10. Os espectros de íons fragmentos para cada um dos íons encontram-se ilustrados na Figura 11. Todos os espectros de íons fragmentos são similares em todas as amostras.

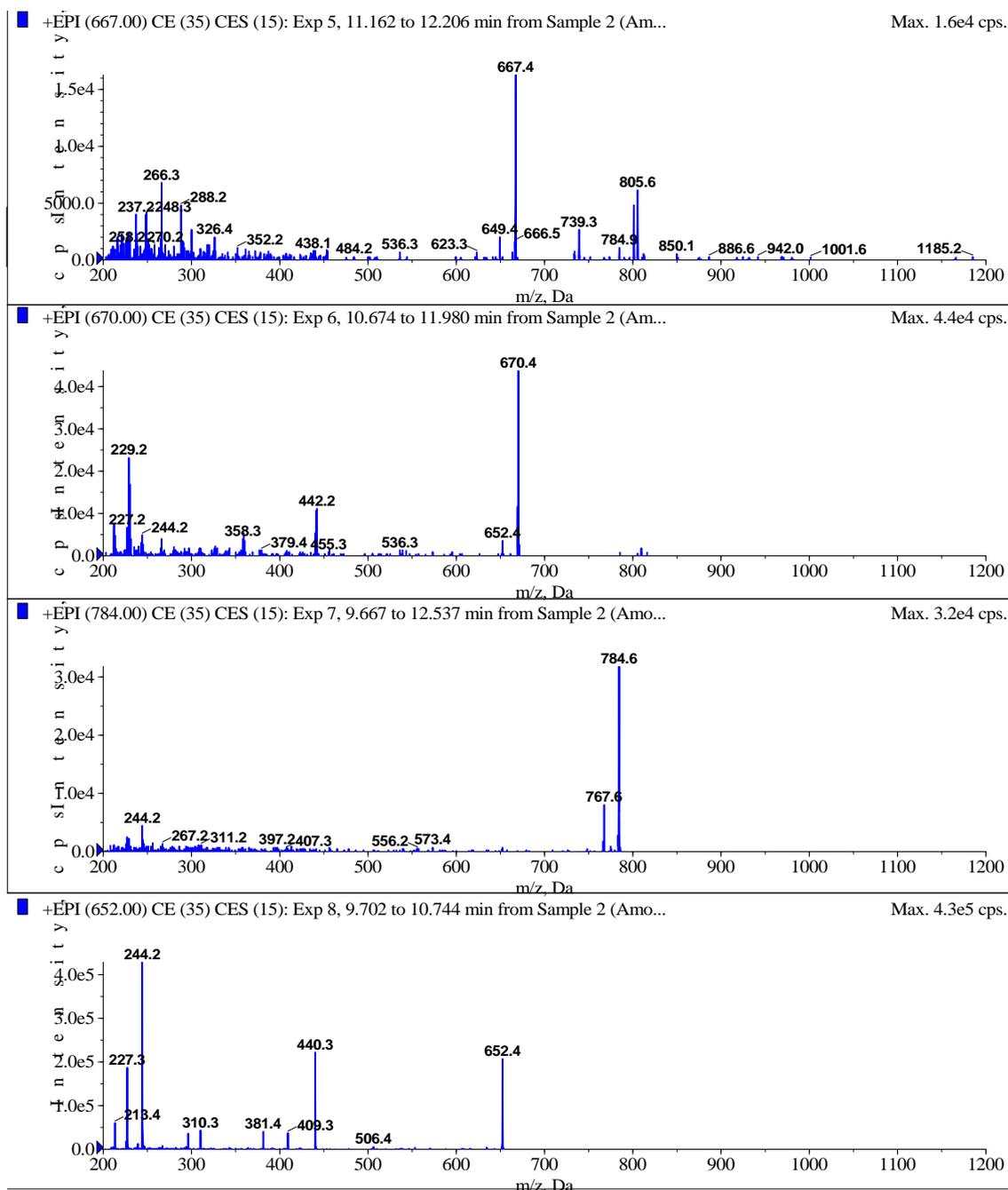


Figura 11 Espectros de íons fragmentos das massas m/z 671, 675, 632, 635, 667, 670, 784 e 652 da amostra 1.

De modo geral, as amostras apresentaram elevada complexidade de dados. Muitas substâncias foram ionizadas e detectadas. Diferentes bandas cromatográficas e diversas m/z foram obtidas, porém para a confirmação de que os compostos detectados são indicativos de nisinas e ou bacteriocinas diversos experimentos devem ser realizados e, na

ausência de padrões, outro tipo de análise é requerida, como por exemplo, análises de massas de alta resolução.

Por meio de testes morfológicos, bioquímicos, espectro de massa e do sequenciamento do DNA 16S (V3-V4) para bactérias, o isolado foi identificado como *Leuconostoc mesenteroides*. O sequenciamento de dados do isolado apresentou 100% de homologia com essa espécie, após uma análise de bioinformática básica para a classificação taxonômica dos *reads*, de acordo com o banco de dados proprietário Neoref (laudo do sequenciamento genético no Anexo A).

A identificação de tal bactéria corrobora os resultados encontrados nas análises de espectro de massas, pois não foi identificada a bacteriocina nisina, mas sim um outro peptídeo que é produzido por esta cepa isolada da água residuária.

Hemme e Scheunemann (2004) relatam a presença de *Leuconostoc* na massa e no amido de mandioca e taro encontrados em países da África. Alguns estudos mostram que já foram isoladas bactérias da água residuária da mandioca com potencial para a produção de amilase e celulose como um estudo realizado por Arotupin (2007), que isolou bactérias e fungos de cinco indústrias diferentes processadoras de mandioca obtendo-se isolados das seguintes bactérias: *Aerococcus viridens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium monihot*, *Lactibacillus acidophilus*. Obadina et al. (2006) isolaram microrganismos dos resíduos da casca da mandioca e encontraram as seguintes espécies de bactérias: *Lactobacillus brevis*, *L. delbrueckii*, *L. sakei*, *L. casei* e *L. plantarum*. Tais microrganismos foram estudados para aumentar o teor de proteínas dos resíduos das cascas de mandioca, para serem utilizadas para enriquecimento de rações, por exemplo.

Até o presente momento há poucos estudos que relatam ter isolado bactérias do ácido láctico com potencial para produção de bacteriocinas de água residuária da indústria de fécula de mandioca.

5.2 Produção de bacteriocinas em meio sintético

Na Tabela 9 são apresentados os dados materiais relativos aos resultados da produção de bacteriocinas em meio sintético MRS, após 15 e 36 horas de fermentação, utilizando como inóculo a cepa *Leuconostoc mesenteroides* isolada da água residuária da indústria de farinha de mandioca.

Tabela 9 Produção de bacteriocinas de *Leuconostoc mesenteroides* em meio sintético MRS, após 15 e 36 horas de fermentação

Tempo de cultivo (h)	Produção de bacteriocinas (AU/mL)	Massa seca (g/L)
15	442,08	0,13
36	323,83	0,52

Observa-se que a cepa isolada da água residuária da indústria de farinha de mandioca tem potencial de produzir bacteriocinas, pois, em 36 horas de fermentação, produziu 323,83 Au/mL. Jozala (2005) testou o potencial de produção da bacteriocina nisina de uma cepa de *Lactococcus lactis* e obteve produção máxima de 524 Au/mL, em meio sintético MRS após 36 horas de fermentação.

A produção de bacteriocina é normalmente realizada em meios de crescimento complexo, como Man Rogosa Sharpe (MRS), M17, caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), caldo de soja tripticase (TSB), extrato de glicose triptona (TGE), pois promovem o crescimento abundante das bactérias e aumentam o nível de bacteriocinas. No entanto, o alto custo para a obtenção desses meios pode inviabilizar a produção em larga escala. Amiali et al. (1998) e Guerra, Rua e Pastrana (2001) comentam que, a complexidade do meio, devido a alguns componentes como, por exemplo, grandes quantidades de proteínas que não são totalmente consumidas durante a fermentação, pode interferir na posterior purificação da bacteriocina.

Assim, a utilização de resíduos de algumas indústrias alimentícias como meio de cultura para a produção de bacteriocinas pode ser adequado, por agregar valor ao resíduo e também permitir o seu aproveitamento, ao invés de ser descartado no ambiente.

O resíduo líquido da indústria de fécula de mandioca tem elevado valor nutricional e pode ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos como, por exemplo, para a produção de bacteriocinas. Água residuária da indústria de fécula de mandioca é rica em carboidratos com altas cargas orgânicas, turbidez, conteúdos de sólidos suspensos e nutrientes como nitrogênio, fosforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, zinco, manganês, cobre, ferro e sódio (OLIVEIRA; REIS; NOZAKI, 2001) e microrganismos como as bactérias do ácido láctico (GOMES et al., 2016), esses resultados são corroborados pela característica da água residuária utilizada neste trabalho (Tabela 3). Portanto, pode ser utilizada como meio de cultura para produção de bacteriocinas, que requer meio rico em nutrientes para sua formação.

5.3 Otimização da produção de bacteriocinas em água residuária da indústria de fécula de mandioca

Na Tabela 10 são apresentados os valores reais das variáveis estudadas no delineamento experimental Plackett Burman (pH, sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio e sulfato de magnésio) e a resposta da produção de bacteriocina pelo halo de inibição.

Tabela 10 Matriz do planejamento experimental Plackett Burman com os valores reais em g/L e suas respostas para a produção de bacteriocinas em Au/mL

Ensaio	pH	Sacarose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	Produção de bacteriocina (Au/mL)
1	6,5	0	10	0	0	237,21
2	6,5	20	0	1,14	0	272,41
3	5,5	20	10	0	1,14	1013,86
4	6,5	0	10	1,14	0	525,53
5	6,5	20	0	1,14	1,14	507,67
6	6,5	20	10	0	1,14	457,64
7	5,5	20	10	1,14	0	186,21
8	5,5	0	10	1,14	1,14	156,64
9	5,5	0	0	1,14	1,14	118,78
10	6,5	0	0	0	1,14	323,83
11	5,5	20	0	0	0	359,24
12	5,5	0	0	0	0	347,02
13	6	10	5	0,57	0,57	65,98
14	6	10	5	0,57	0,57	131,76
15	6	10	5	0,57	0,57	65,98

Na Figura 12 é apresentado o gráfico de Pareto, que demonstra os efeitos das variáveis independentes na produção de bacteriocinas no delineamento PB.

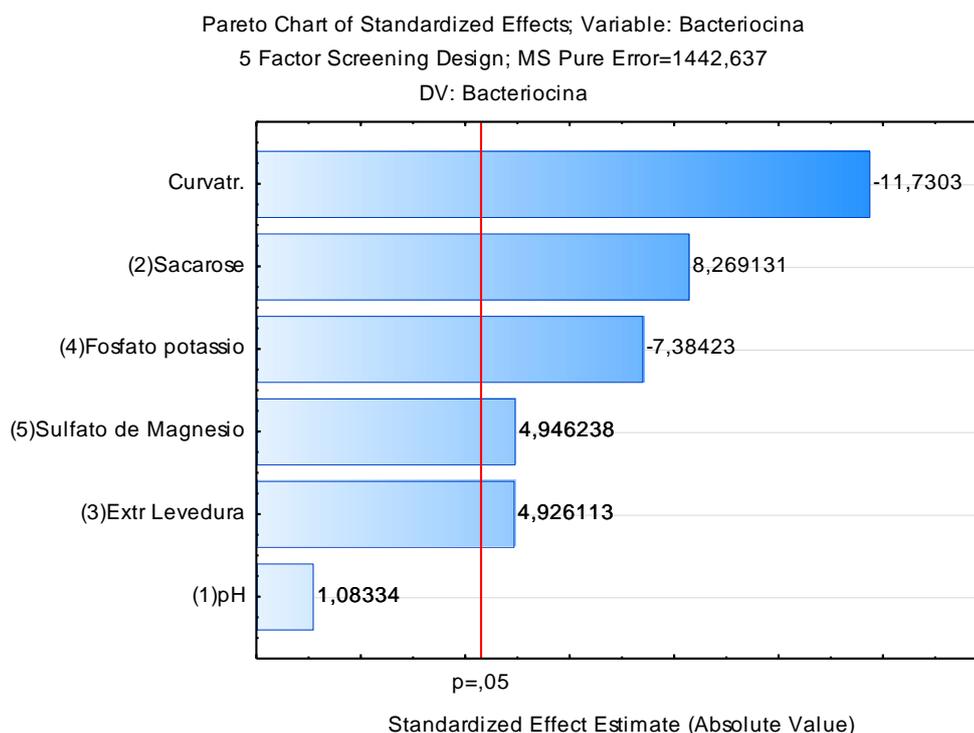


Figura 12 Gráfico de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no planejamento experimental Plackette Burman, para a produção de bacteriocinas.

A produção de bacteriocinas nos diferentes ensaios variou entre 65,98 Au/mL (ensaio 15) e 1013,86 Au/mL (ensaio 3). As variações entre os tratamentos demonstram que o delineamento experimental escolhido respondeu aos parâmetros estudados.

Observa-se que a variável pH foi a única que não apresentou efeito significativo sobre a produção de bacteriocinas. As quatro demais variáveis apresentaram efeito significativo, ao nível de 95% de confiança, o que significa que, quando a concentração dessas variáveis aumenta do nível -1 para +1, ocorre aumento na produção de bacteriocinas no processo de fermentação. Isso pode ter ocorrido porque a estirpe produtora de bacteriocinas, sendo uma bactéria do ácido lático, é considerada bactéria fastigiosa que exige requerimentos nutricionais elevados, ou seja, demanda abundância de nutrientes para seu crescimento e metabolismo celular (LIU et al., 2004). Como a curvatura teve efeito significativo, para otimizar a produção de bacteriocinas, deve-se aumentar moderadamente a concentração das variáveis estudadas. Apesar do fosfato de potássio ter seu efeito significativo, o gráfico de Pareto (Figura 12) indica que uma leve redução da sua concentração pode melhorar o desempenho na produção de bacteriocinas.

Neste experimento o pH não apresentou efeito significativo, provavelmente, porque os níveis testados -1 (5,5), +1 (6,5), encontram-se muito próximos do ideal. Estudos demonstram que valores de pH indicados para a produção de bacteriocinas encontram-se entre 5,5 e 6 (OZEL et al., 2018; KIM; HALL; DUNN et al., 1997, AMIALI et al., 1998, GUERRA; RUA; PASTRANA, 2001).

O fosfato de potássio foi uma variável escolhida para ser utilizada na produção de bacteriocinas por apresentar propriedade tamponante relativamente elevada e assim retardar a queda do pH causada pela produção de ácido láctico, que limita o crescimento da bactéria e, conseqüentemente, a produção de bacteriocinas (ZOUH et al., 2008). Como a água residuária utilizada como meio de cultura já possui concentração de potássio de 685,62 mg/L (Tabela 3) e como foram obtidas produções de bacteriocinas em ensaios sem a suplementação de fosfato de potássio, optou-se por não enriquecer o meio com este sal.

Observa-se que no delineamento PB a maior produção de bacteriocinas (1013 Au/mL) ocorreu no ensaio 3 (Tabela 8) em que a água residuária da fecularia de mandioca foi enriquecida com o maior nível de sacarose (20 g/L), maior nível de extrato de levedura (10 g/L), menor nível de fosfato de potássio (correspondente ao valor presente no resíduo in natura), maior nível de sulfato de magnésio (1,14 g/L) e o menor nível de pH de (5,5).

Portanto, para realizar o delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) foram selecionados os fatores sacarose, extrato de levedura e sulfato de magnésio. Na Tabela 11 são apresentadas as referências relativas à matriz do planejamento composto central rotacional (DCCR) com valores reais em g/L, à produção de bacteriocinas, à produção de ácido láctico, à produção de ácido acético, à eficiência de remoção da demanda química de oxigênio, à eficiência de remoção de açúcar e ao pH final, para cada fermentação realizada no tempo de 36 horas.

Tabela 11 Matriz do planejamento experimental DCCR com os valores reais e codificados das variáveis independentes e os valores obtidos para bacteriocinas, eficiência de remoção de DQO, eficiência de remoção de açúcares totais, ácido lático, ácido acético, massa seca e pH, após 36 horas de fermentação

Variáveis Independentes				Variáveis Respostas						
Ensaio	Sacarose g/L	Extrato de Levedura (g/L)	Sulfato de Magnésio (g/L)	Produção de bacteriocina (AU/mL)	Eficiência de remoção de DQO (%)	Eficiência de remoção de açúcar (%)	Produção de Ác. Lático (g/L)	Produção de Ác. Acético (g/L)	Massa seca (g/L)	pH final
1	6,07 (-1)	7,02 (-1)	0,30 (-1)	507,67	27,26	73,59	6,74	4,22	0,88	4,15
2	23,93 (+1)	7,02 (-1)	0,30 (-1)	544,03	5,19	40,35	8,18	5,00	0,96	3,91
3	6,07 (-1)	12,98 (+1)	0,30 (-1)	359,24	9,30	81,92	7,14	4,87	0,93	4,17
4	23,93 (+1)	12,98 (+1)	0,30 (-1)	323,83	1,44	63,18	8,55	5,39	0,96	4,05
5	6,07 (-1)	7,02 (-1)	1,50 (+1)	563,17	21,96	85,30	6,49	4,02	0,72	4,13
6	23,93 (+1)	7,02 (-1)	1,50 (+1)	96,52	3,55	25,73	6,86	4,01	0,80	4,06
7	6,07 (-1)	12,98 (+1)	1,50 (+1)	795,87	2,26	80,94	7,41	4,92	0,88	4,22
8	23,93 (+1)	12,98 (+1)	1,50 (+1)	1247,67	47,73	47,13	8,48	5,15	0,78	4,20
9	0 (- α)	10 (0)	0,75 (0)	525,53	13,48	62,27	3,86	2,77	0,53	4,78
19	30 (+ α)	10 (0)	0,75 (0)	507,63	13,91	40,98	5,90	3,49	0,86	4,10
11	15 (0)	5 (- α)	0,75 (0)	302,19	2,90	65,78	5,12	2,75	0,84	4,08
12	15 (0)	15 (+ α)	0,75 (0)	442,08	6,51	80,66	8,18	5,09	0,98	4,10
13	15 (0)	10 (0)	0 (- α)	544,03	7,95	66,10	7,57	4,65	0,92	4,12
14	15 (0)	10 (0)	1,50 (+ α)	693,04	2,40	65,51	8,32	5,15	4,65	4,16
15	15 (0)	10 (0)	0,75 (0)	603,50	7,39	70,07	8,96	5,55	1,05	4,08
16	15 (0)	10 (0)	0,75 (0)	768,81	1,82	73,31	11,61	7,27	1,09	3,96
17	15(0)	10 (0)	0,75 (0)	563,17	4,41	8,34	10,56	6,53	1,01	3,92

Na Figura 13 é apresentado o gráfico de Pareto que demonstra os efeitos das variáveis independentes na produção de bacteriocinas no DCCR.

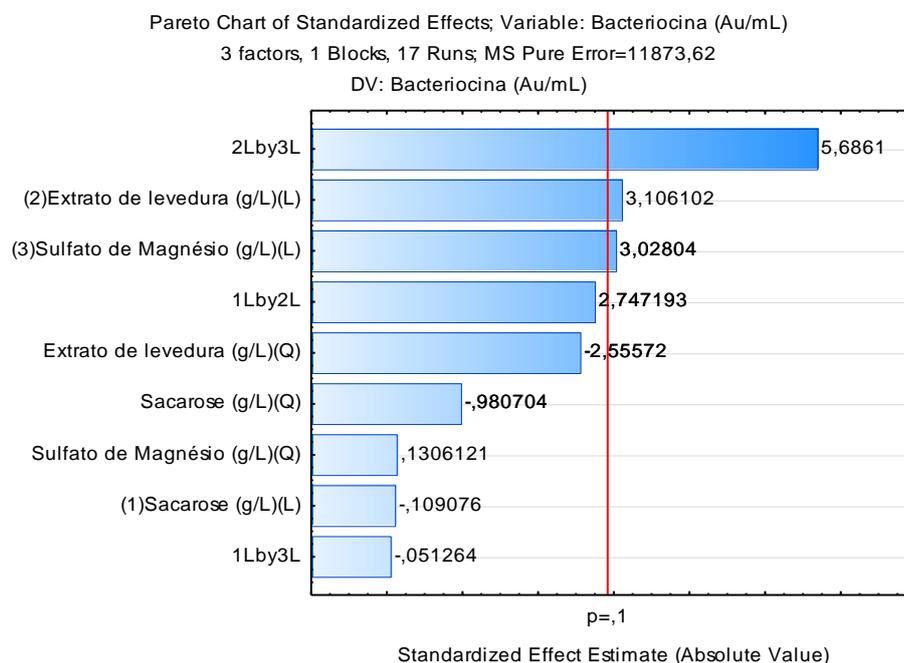


Figura 13 Gráfico de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no delineamento central composto rotacional, para a produção de bacteriocina.

A produção de bacteriocina variou, nos diferentes tratamentos, entre 96,52 e 1247,67 Au/mL. O tratamento 8, que teve a maior produção de bacteriocina, estava presente o maior nível (+1) para todas as variáveis testadas (sacarose, extrato de levedura e sulfato de magnésio). A menor produção de bacteriocina foi obtida no tratamento 6 (96,52 Au/mL) em que o menor nível (-1) era para a variável extrato de levedura e o maior (+1) para as variáveis sacarose e sulfato de magnésio.

O gráfico de Pareto (Figura 13) mostra que a sacarose não apresentou efeito significativo na produção de bacteriocina, indicando que não seria necessária a suplementação da água residuária de fecularia com o açúcar. Cabe lembrar que o fornecimento adequado de carbono no meio de cultura é importante, tendo em vista que a bacteriocina é um produto do metabolismo primário, sendo sua produção influenciada pelo tipo e pela concentração da fonte de carbono (PAPAGIANNI; AVRAMIDIS; FILIOUSIS, 2007).

Os resultados obtidos nos ensaios desta pesquisa expõem (Tabela 11 e Figura 13) a necessidade de se suplementar a água residuária da indústria de fécula de mandioca com o extrato de levedura e o sulfato de magnésio, que são fontes de nitrogênio e de magnésio, respectivamente, necessários no meio de cultura para o desenvolvimento da estirpe bacteriana e consequente produção de bacteriocinas. O enriquecimento de resíduos da

agroindústria para a produção de bacteriocinas também foi relatado em outros trabalhos, como o realizado por Daba et al. (1991) que suplementaram o soro de leite com extrato de levedura (20 g/L) e Tween 80, e observaram um aumento da produção da bacteriocina Mesenterocina 5, produzida pela estirpe *Leuconostoc mesenteroides* durante a fermentação.

A sacarose adicionada ao meio de cultura foi consumida e convertida em ácido láctico, ácido acético e outros metabólitos como a bacteriocina (Tabela 11), confirmando a via de fermentação heterofermentativa do *Leuconostoc mesenteroides*. Drosino et al. (2006) estudaram a produção de bacteriocinas, a partir de uma cepa de *Leuconostoc mesenteroides* E 131 isolada de salsicha e, também, obtiveram consumo de glicose e presença de ácido láctico, ácido acético e outros metabólitos, comprovando a natureza heterofermentativa da cepa isolada.

Nos pontos centrais do delineamento os ensaios 15, 16 e 17 obtiveram produção de bacteriocinas de 603,50; 768,81; 563,17 Au/mL respectivamente. As maiores concentrações de biomassa (massa seca) foram registradas para os ensaios 15 de 1,05 g/L, para o ensaio 16 foi de 1,09 g/L e para o ensaio 17 foi de 1,01 g/L (Tabela 11). As maiores concentrações de massa seca não corresponderam com as melhores produções de bacteriocinas.

Esses ensaios também apresentaram as maiores concentrações de ácidos orgânicos, 8,96; 11,61; 10,56 g/L respectivamente para ácido láctico, já para o ácido acético as concentrações encontradas foram para a primeira repetição do ponto central (ensaio 15) de 5,55 g/L; para o ensaio do ponto central 16 foi de 7,27 g/L; e para a última repetição do ponto (ensaio 17) foi de 6,53 g/L, e conseqüentemente os menores valores de pH final médio de 3,9.

A relação entre a produção de bacteriocinas e o crescimento celular foi bem estudada e, geralmente, a produção máxima de bacteriocinas corresponde à concentração máxima de massa celular (MATSUAKI et al., 1996), porém, a produção dos ácidos interferem na produção de bacteriocinas. Este resultado também foi constatado por Simsek et al. (2009), que avaliaram a produção de nisina em diferentes cepas de bioengenharia, em que o pH baixo do meio de cultura, em média 4,25, indicou que a redução da produção da bacteriocina foi, provavelmente, devida à inibição do produto final pelo ácido láctico.

O que, possivelmente, ocorreu neste estudo, em que as maiores concentrações de biomassa não obtiveram os maiores títulos de bacteriocinas, foi devido à queda do pH do meio de fermentação pela formação dos ácidos orgânicos, não ocorrendo a melhor produção de bacteriocinas.

5.4 Análise da superfície de resposta do DCCR

O modelo que descreve o comportamento de produção de bacteriocinas com base nos fatores: extrato de levedura e sulfato de magnésio, que apresentaram efeitos significativos no intervalo de confiança de 90% é descrito na Equação 6.

$$PB = 552,23 + 91,62 y + 89,32 z + 219,06 y.z. \quad (6)$$

em que:

PB= produção de bacteriocina (Au/mL);

Y:=extrato de levedura (g/L);

Z:=sulfato de magnésio (g/L).

O modelo de regressão para os dados da produção de bacteriocina apresentou $R^2 = 0,74$, o que representa que 74% da variação da eficiência da produção de bacteriocina é explicada pelo modelo apresentado.

As interações lineares e quadráticas não foram significativas. Os dados relativos aos resultados da análise de variância do modelo (eq. 2) são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 Análise da variância (ANOVA) para a variável resposta produção de bacteriocinas

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Fcal	Ftab
Regressão	607319,55	3	202439,85	6,89	2,56
Resíduo	381836,45	13	29372,03		
Falta de ajuste	358089,20	11	32553,56	2,74	9,40
Erro puro	23747,25	2	11873,62		
Total	989156,00	16			

A análise da variância (ANOVA), para a resposta produção de bacteriocina, indicou que o modelo obtido pode ser considerado predito, pois, para um nível de confiança de 90%, o teste F indicou um F calculado superior ao F tabelado. A falta de ajuste não foi significativa no mesmo nível de confiança, ou seja, F calculado foi menor que o F tabelado.

A partir dos resultados do delineamento composto central rotacional, foram geradas as superfícies de resposta a fim de verificar as regiões experimentais que geram os melhores resultados. Na Figura 14 é apresentada a superfície de resposta para a produção de bacteriocinas em função dos parâmetros extrato de levedura e sulfato de magnésio.

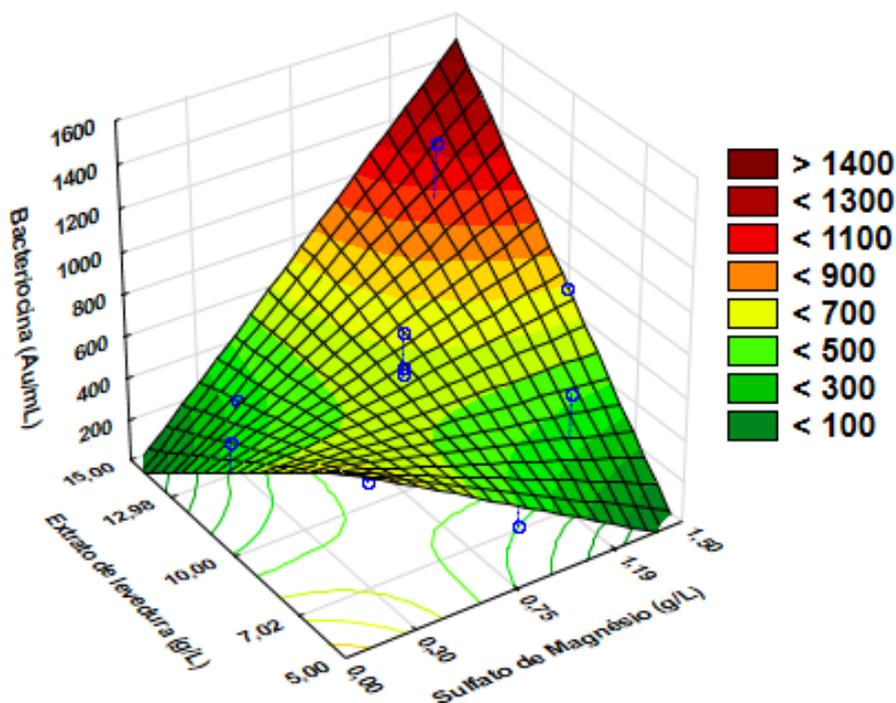


Figura 14 Superfície de resposta para produção de bacteriocinas em função das variáveis sulfato de magnésio e extrato de levedura.

O gráfico da superfície de resposta (Figura 14) indica que a produção de bacteriocinas pela cepa de *Leuconostoc mesenteroides* aumenta com o aumento da dosagem de sulfato de magnésio e extrato de levedura.

Simske et al. (2009) também estudaram a influência da fonte de nitrogênio na produção da bacteriocina nisina em cepas de *Lactococcus lactis* de bioengenharia, e observaram que houve aumento da produção de nisina utilizando como fonte de nitrogênio o extrato de levedura, corroborado pelos resultados obtidos neste estudo. Esta fonte de nitrogênio é considerada de vital importância, devido à estimulação do crescimento celular.

Em outro estudo realizado por Meghorous et al. (1992), em que testaram a produção de nisina pela cepa *Lactococcus lactis* subespécie *lactis*, foram verificados vários sais que poderiam produzir efeito significativo na produção da bacteriocina nisina e foi observado que apenas o sulfato de magnésio teve efeito na produção de nisina, ou seja, houve aumento na produção da bacteriocina, com o aumento da concentração de sulfato de magnésio. Este resultado também é confirmado no presente estudo que otimizou a produção de bacteriocinas produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, em que aumentando a concentração do íon sulfato de magnésio também aumentou o nível de produção de bacteriocinas.

5.5 Otimização da produção de bacteriocinas

5.5.1 Obtenção do ponto ótimo para o processo de produção de bacteriocina

A partir dos dados obtidos na etapa anterior deste estudo, foi possível a obtenção do ponto ótimo para o processo de produção de bacteriocinas utilizando como substrato a água residuária da indústria de mandioca.

Na Figura 18 são ilustradas as curvas de cada uma das variáveis em análises, em função de cada uma das respostas e a sobreposição desses dados, de maneira que se otimizasse o processo estudado.

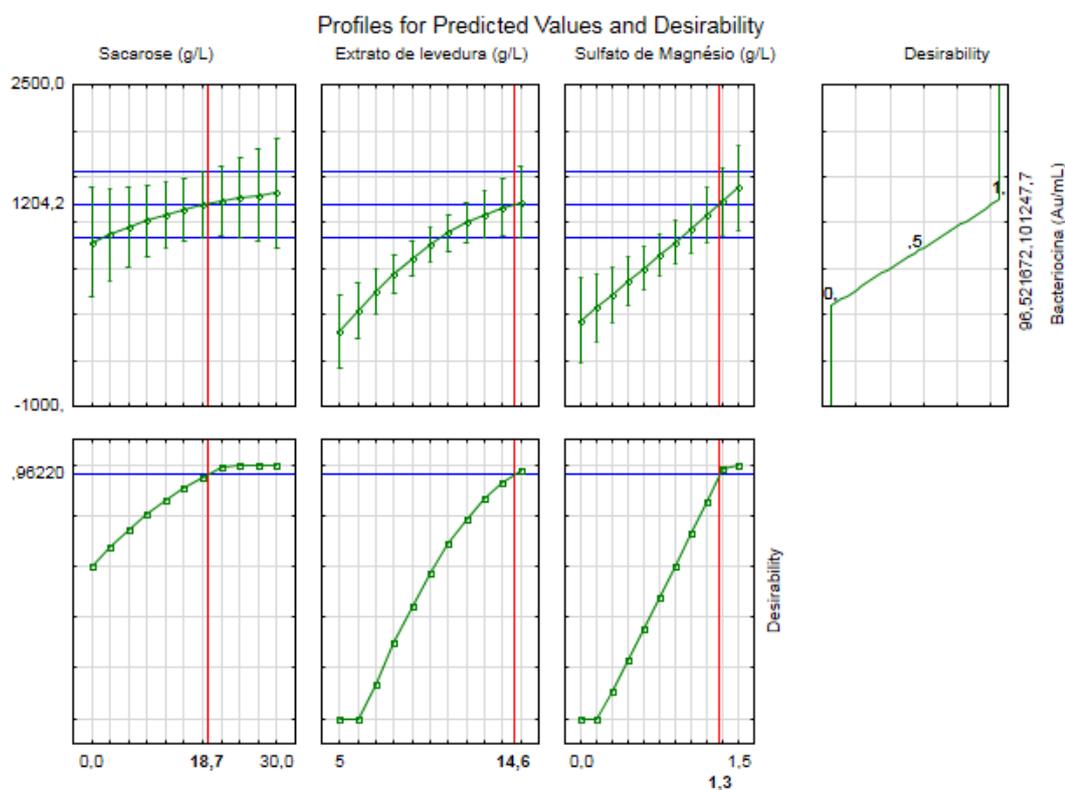


Figura 15 Ponto ótimo para produção de bacteriocinas, determinado pelo método de desejabilidade

Na Figura 15 verifica-se que o ponto ótimo para produção de bacteriocinas é a concentração de sacarose 18,7 g/L, extrato de levedura 14,6 g/L e sulfato de magnésio 1,30 g/L, para obtenção de 1204,2 Au/mL de bacteriocina. Em geral, as concentrações ótimas de açúcares para a produção da bacteriocina nisina relatada estavam entre 3 e 4% (PONGTHARANGKUL; DEMIRCI, 2006), o que é corroborado pelo obtido neste estudo, em

que a melhor produção de bacteriocinas produzidas pela cepa *Leuconostoc mesenteroides* ocorreu utilizando 2,8% de sacarose no meio de cultura.

5.5.2 Obtenção da cinética de produção de bacteriocinas utilizando água residuária autoclavada e enriquecida

Para fins de validação do processo de produção de bacteriocinas, utilizando a cepa *Leuconostoc mesenteroides* e a água residuária da indústria de fécula de mandioca como substrato para o crescimento do microrganismo, foi realizado um experimento de cinética de produção de bacteriocinas, durante 35 h de fermentação, com amostras retiradas a cada 5 h.

Na Tabela 13 encontram-se os valores da produção de bacteriocinas, produção de ácido láctico, produção de ácido acético, eficiência de remoção da demanda química de oxigênio, eficiência de remoção de açúcar e massa seca, para as fermentações realizadas para se estabelecer a cinética da produção de bacteriocinas, utilizando o ponto ótimo do delineamento experimental DCCR para enriquecer água residuária da indústria de fécula de mandioca.

Tabela 13 Análises da produção de bacteriocinas, produção de ácido láctico, produção de ácido acético, eficiência de remoção de DQO, eficiência de remoção de açúcar, massa seca, retirada a cada 5 horas durante a fermentação em frascos de agitação, para obtenção da cinética de produção de bacteriocina

Tempo de fermentação em horas	Produção de bacteriocina (Au/mL)	Produção de ácido Láctico (g/L)	Produção de ácido Acético (g/L)	Ef. de remoção de DQO (%)	Ef. de remoção de açúcar (%)	Massa seca (g/L)
5	0	6,88	2,16	4,84	13,47	1,24
10	795,87	8,43	2,74	7,26	41,25	0,86
15	1205,26	7,68	2,66	7,00	57,02	0,67
20	186,21	8,64	2,82	5,86	59,84	0,82
25	624,74	9,80	3,27	9,68	36,45	0,90
30	1049,54	8,97	3,17	5,73	38,01	0,77
35	442,08	9,40	3,33	7,77	78,64	0,81

Na Figura 16 é apresentada a cinética de produção de bacteriocinas (Au/mL), com amostras retiradas a cada 5 horas, durante o processo de fermentação.

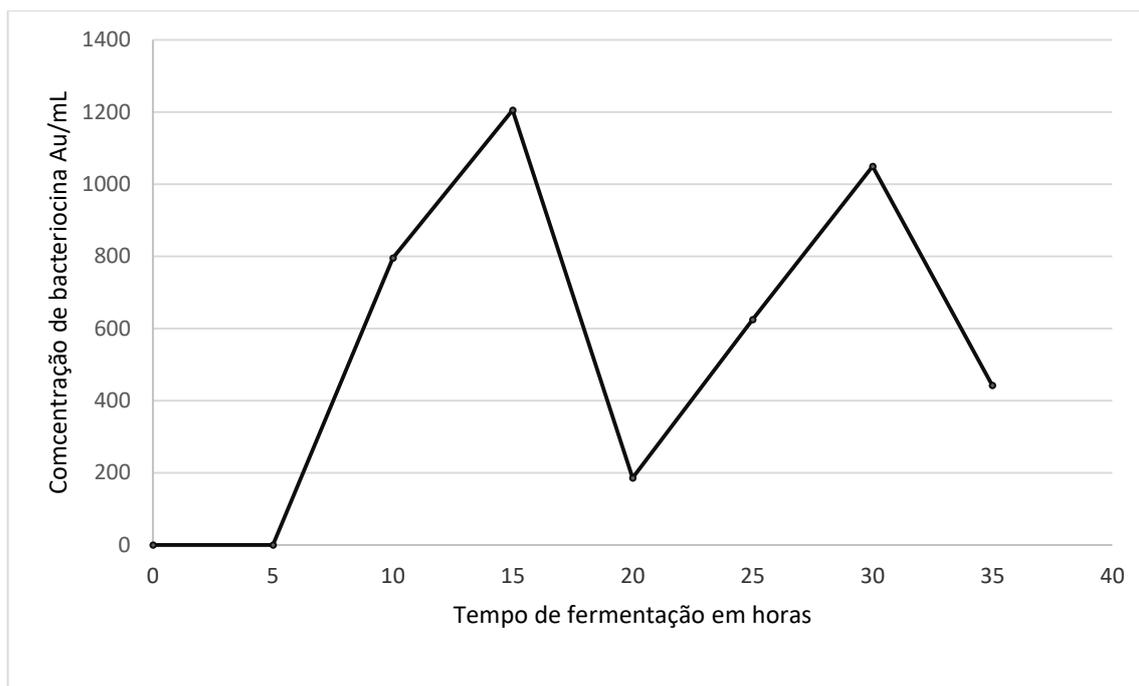


Figura 16 Cinética de produção de bacteriocina em função do tempo.

O maior título de bacteriocina foi de 1205,58 Au/mL, no tempo de 15 horas de fermentação (Figura 16). Mathieu et al. (1993) estudaram a biossíntese da bacteriocina Mesenterocina 52 e sua secreção durante o processo de fermentação e observaram a máxima produção de 1300 Au/mL, no tempo de 15 horas de fermentação, o que é corroborado pelo resultado obtido neste estudo, que utiliza a mesma espécie de bactéria produtora de bacteriocina, o *Leuconostoc mesenteroides*.

Resultado que corrobora o encontrado por outros pesquisadores que também estudaram a produção de diferentes bacteriocinas, como Cheigh et al. (2002) que obtiveram máxima produção da bacteriocina nisina em 15 horas de fermentação e término da produção em 30 horas.

Ozel et al. (2018) encontraram máxima produção de nisina em condições ótimas entre 8 e 10 horas de fermentação e explicam que a produção de nisina diminui após este ponto, muito provavelmente, devido à degradação proteolítica ou à adsorção de nisina nas células produtoras, esse fenômeno de degradação e adsorção pode ter ocorrido na fermentação com *Leuconostoc mesenteroides*, o que pode explicar o tempo de melhor produção de bacteriocinas em 15 horas, caindo os títulos de bacteriocinas com o passar do tempo de fermentação como observado na Figura 16.

Em outro estudo, para se obter a otimização da produção de nisina a partir do soro de leite obtiveram a concentração máxima com 12 horas de fermentação com título de 92,13 mg/L de nisina (LIU et al., 2003).

Neste experimento há uma melhora na produção da bacteriocina em 36,67% em 15 horas de fermentação utilizando, a água residuária da indústria de fécula de mandioca otimizada, em comparação com meio sintético MRS (Tabela 9).

Na Figura 17, visualiza-se a produção de bacteriocina em água residuária otimizada e a eficiência de remoção de DQO e açúcar em função do tempo de fermentação.

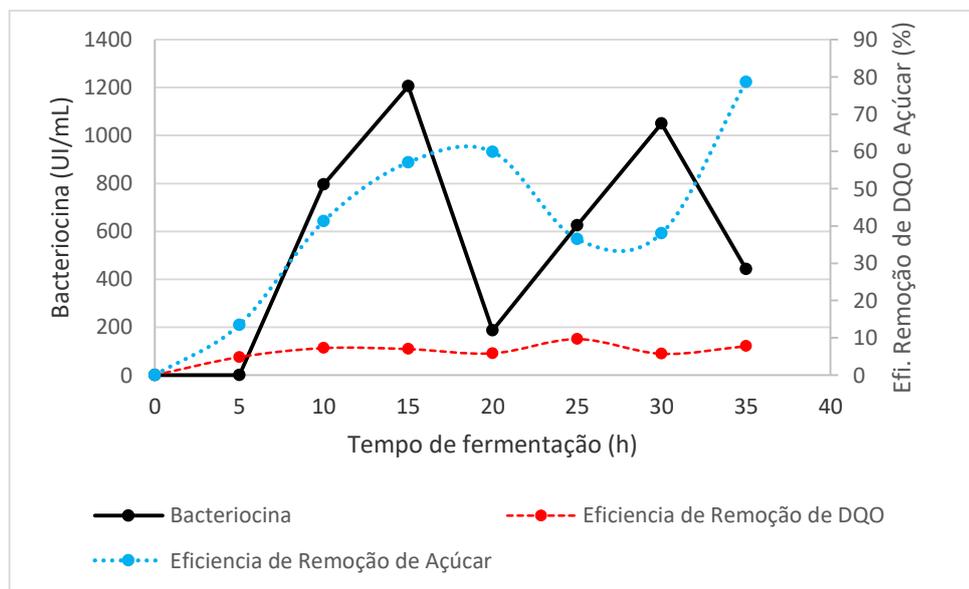


Figura 17 Produção de bacteriocinas e eficiência de remoção de açúcar e de DQO em função do tempo de fermentação.

Verifica-se que a eficiência de remoção de DQO é independente da produção de bacteriocinas, pois a eficiência de remoção de DQO mesmo que seja baixa uma média de 6,87%, mantém-se sempre constante durante o tempo de fermentação, porém a produção de bacteriocina tem um pico em 15 horas, em seguida ocorrem oscilações na produção de bacteriocinas (Figura 17).

A eficiência de remoção de açúcar vai aumentando durante o tempo de fermentação ocorrendo um decréscimo de eficiência em 25 horas de fermentação, aumentando novamente a eficiência de remoção de açúcar até o fim do processo de fermentação que ocorre em 35 horas. A água residuária da indústria de fécula de mandioca suplementada com 27 g/L de sacarose, torna a fonte de carbono muito mais abundante do que o caldo MRS que contém 14 g/L de glicose, provavelmente devido a esse fator de maior disponibilidade de fonte de carbono obtém-se uma maior produção de bacteriocina na água residuária suplementada do que no caldo MRS, como se observa no gráfico da Figura 17, a maior produção de bacteriocina ocorre quando vai aumentando a eficiência de remoção de açúcar.

No gráfico da Figura 18, apresenta-se a produção de bacteriocinas e a formação de ácido lático e ácido acético durante a cinética de produção de bacteriocina, realizada na validação do delineamento experimental DCCR.

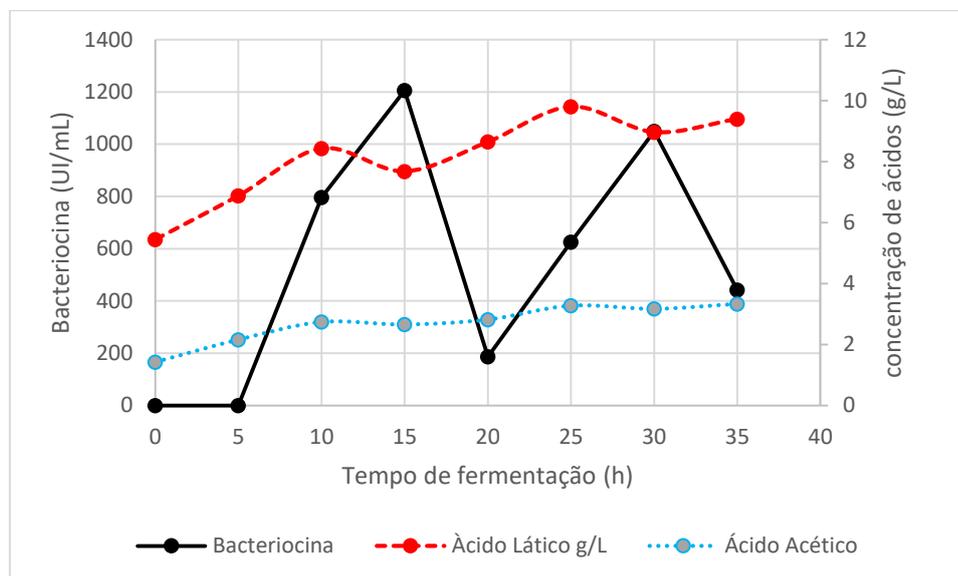


Figura 18 Produção de bacteriocina e formação de ácido lático e ácido acético em função do tempo de fermentação.

A produção do ácido lático e ácido acético também se mantém sempre constante, durante o processo de fermentação, e ocorre independente da produção de bacteriocinas que apresenta oscilações durante o processo de fermentação. Essas oscilações na formação de bacteriocinas podem ocorrer, devido à degradação e adsorção da bacteriocina nas células, conforme explicado por Ozel et al. (2018).

Existem poucos estudos que relatam essa abordagem interessante da produção de bacteriocinas de várias linhagens utilizando matérias primas, resíduos ou subprodutos como substrato de baixo custo para o desenvolvimento de microrganismo e produção de seus metabólitos. Um estudo realizado para a produção de bacteriocina utilizando como estirpe produtora *Leuconostoc mesenteroides* E131, testou diferentes fontes de carbono de baixo custo como glicose, sacarose, frutose e resíduo de melão, houve a produção de bacteriocina em todas as fontes testadas, no melão a produção de bacteriocina foi de 320 AU/mL, além disso, houve a descoloração do resíduo (METSOVITI et al., 2011).

Outro estudo utilizou resíduos do processamento de mexilhões para o crescimento e produção de bacteriocinas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Pediococcus acidilactis*, a produção de bacteriocina foi modelada e ajustada segundo o pH (GUERRA; CASTRO, 2002). Leães et al. (2011) testaram vários subprodutos para a produção de bacteriocina como soro de queijo em pó que é um resíduo da produção de mussarela, farinha de peixe, resíduos de uva, proteína de soja, resíduo de soja fibrosa e farelo de soja, a bacteriocina utilizada para

testar esses diferentes subprodutos foi a *Bacillus* sp. 11. O subproduto que obteve melhor rendimento para a produção de bacteriocina foi o farelo de soja.

É importante estudar essas fontes alternativas de meio de cultivo, pois além de possibilitarem minimizar o custo de produção de bacteriocinas, auxiliam na redução de poluentes do meio ambiente e também se tornam formas de reaproveitamento da matéria prima.

5.6 Determinação da produção de bacteriocinas em reator em bateladas sequenciais

5.6.1 Produção de bacteriocinas em reator em bateladas sequenciais utilizando água residuária autoclavada

A produção de bacteriocinas realizada em escala maior em um reator em bateladas sequenciais, ocorreu durante 8 dias, em que foram conduzidos 13 ciclos de 15 horas. Na Tabela 16 encontram-se os dados referentes aos valores da produção de bacteriocinas, ácido láctico, ácido acético, eficiência de remoção da DQO, eficiência de remoção de açúcares totais e pH final, para cada ciclo de fermentação realizado no reator em bateladas sequenciais, utilizando como substrato a água residuária de fecularia autoclavada e enriquecida com sacarose (27,80 g/L), extrato de levedura (13,60 g/L) e sulfato de magnésio (1,40 g/L), que representam a condição ótima do meio definida no DCCR.

Tabela 14 Resultados obtidos nos ensaios de fermentação em reator em bateladas sequenciais com água residuária autoclavada e otimizada de acordo com o DCCR

N.º ciclos	T. O. (h)	Bact (AU/ mL)	Ác. láctico (g/L)	Ác. acético (g/L)	Remoção de DQO (%)	Remoção de açúcares totais	Massa seca (g/L)	pH final
1	15	1535,39	9,62	3,52	1,25	6,10	0,57	4,10
2	30	2579,41	10,39	4,17	19,70	6,09	0,49	4,08
3	45	141,20	20,77	4,28	23,88	44,32	0,81	3,93
4	60	27,79	8,41	0,79	19,94	22,86	0,80	4,01
5	75	61,57	13,60	3,15	4,70	3,02	0,70	4,12
6	90	16,54	13,95	1,72	4,80	80,10	0,73	4,01
7	105	131,76	16,07	3,68	10,09	82,78	0,61	4,04
8	120	55,50	13,01	1,76	12,21	15,15	0,45	4,11
9	135	192,76	14,97	3,64	15,26	22,49	0,40	4,30
10	150	141,20	14,42	3,77	2,62	69,76	0,56	4,21
11	165	384,96	17,69	3,67	6,29	27,38	0,44	4,27
12	180	221,36	16,94	3,63	9,68	64,76	0,55	3,95

13	195	167,86	15,41	3,51	3,32	50,82	0,67	3,98
----	-----	--------	-------	------	------	-------	------	------

Nota: T.O.: tempo de operação; Bact.: bacteriocina.

Os tempos de operação em que houve maior produção de bacteriocinas foram os tempos 15 e 30 horas, com 1535,39 AU/mL e 2579,41 AU/mL, respectivamente. Os tempos de operação com as menores produções de bacteriocinas foram os tempos de 60 e 90 horas, com 27,79 AU/mL e 16,54 AU/mL. A maior concentração de ácido láctico e ácido acético ocorreu com 45 horas de operação, atingindo a concentração de 20,77g/L e 4,17 g/L, respectivamente, demonstrando que os microrganismos presentes no meio utilizavam a rota heterofermentativa. Neste mesmo tempo de operação (45 horas), o pH final foi de 3,93 e a concentração de biomassa de 0,81 g/L, a maior dentre todos os tempos de operação.

A remoção média de DQO foi de 8,89 %, sendo o maior valor (23,88 %) registrado com 45 horas de operação. O maior valor de eficiência de remoção de açúcares totais ocorreu com 105 horas de operação (82,78%). Os valores de eficiência de remoção de DQO e de açúcares totais dos ensaios realizados no reator em bateladas sequenciais e dos frascos no DCCR foram semelhantes (Tabelas 11 e 16).

Na Figura 19, visualiza-se o gráfico da produção de bacteriocinas no reator em bateladas sequenciais.

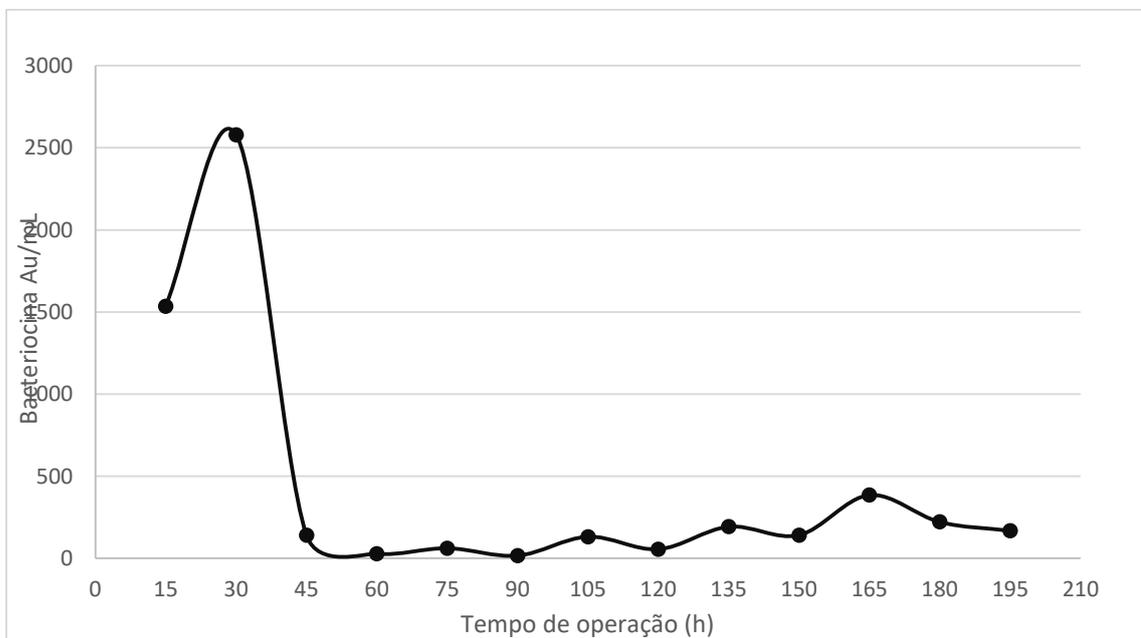


Figura 19 Produção de bacteriocinas pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* em água residuária da indústria de fécula de mandioca autoclavada em reator AnSBR.

O pico de produção de bacteriocinas ocorreu com 30 horas de operação, a partir daí houve queda acentuada nos títulos de bacteriocina (141,5 Au/mL com 45 horas de fermentação), mantendo-se com média de 153 Au/mL até o fim do processo de operação.

A fermentação em reator em bateladas sequenciais apresentou produção de bacteriocinas 56,76% (2579,41 Au/mL) (Tabela 16), maior do que o valor obtido na fermentação realizada em frascos no DCCR (1205,23 Au/mL) (Tabela 11). Esse aumento no desempenho da produção de bacteriocinas no reator em bateladas sequenciais também foi observado por Drosinos et al. (2005), quando realizou ensaios com o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* E131 em frascos menores e no reator em bateladas sequenciais com volumes maiores.

Naghmouchi et al. (2008) sugeriram que a melhora na produção dos títulos de bacteriocinas também pode ter ocorrido devido à fermentação ter sido pelo processo de batelada sequencial, pois métodos convencionais de fermentação usando células livres e processos descontínuos, como foi realizado nos frascos com agitação para o DCCR apresentam desvantagens, já que os níveis de produção de bacteriocinas são normalmente mais baixos. Porém, outros fatores podem influenciar nos níveis de produção de bacteriocina, como esta é produzida na fase exponencial de crescimento e pode ser afetada por vários parâmetros de fermentação, como composição do meio de fermentação, pH, temperatura de crescimento e taxa de aeração.

Na Figura 20, visualiza-se o gráfico da produção de bacteriocinas e a formação de biomassa (massa seca) durante o processo de fermentação, utilizando água residuária autoclavada e na composição definida como ótima no delineamento experimental DCCR.

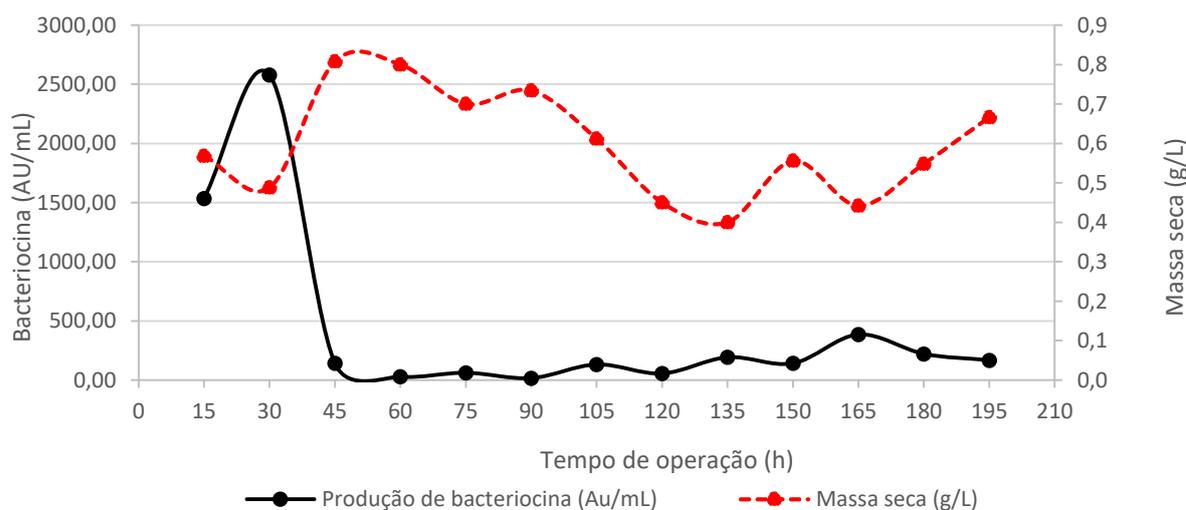


Figura 20 Produção de bacteriocinas e formação de massa seca pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca autoclavada.

Com 30 horas de operação houve uma alta produção de bacteriocina (2579,41 Au/mL) e baixa formação de biomassa (0,49 g/L). Esse comportamento também foi observado em um estudo sobre a produção da bacteriocina Thermophilim T por *Streptococcus thermophilus* em um fermentador em batelada alimentada (AKTYPIS et al., 2007). Com o aumento da temperatura de fermentação ocorreu a produção máxima de bacteriocina em um menor tempo e a menor formação de biomassa.

Esse comportamento pode ocorrer porque o aumento da massa celular não garante, necessariamente, a síntese satisfatória da bacteriocina, uma vez que condições ambientais como temperatura, pH, meio de cultura que conduzem a elevados rendimentos de biomassa, podem ter um efeito negativo nas vias envolvidas na síntese de bacteriocina (AKTYPIS et al., 2007), o que provavelmente pode ter ocorrido neste estudo. Outros fatores também podem ter influenciado a elevada produção de bacteriocina e a baixa formação de biomassa como, por exemplo, o volume da fermentação maior no reator e também a forma de agitação que pode ter sido mais eficiente no reator AnSBR, pois, no reator, a agitação ocorre por pás e nos delineamentos experimentais que utilizam frascos a agitação ocorreu em *shaker*.

Na Figura 21 são apresentados os resultados de produção de bacteriocinas em água residuária autoclavada otimizada e da eficiência de remoção de DQO e eficiência de consumo de açúcares totais em função do tempo de operação.

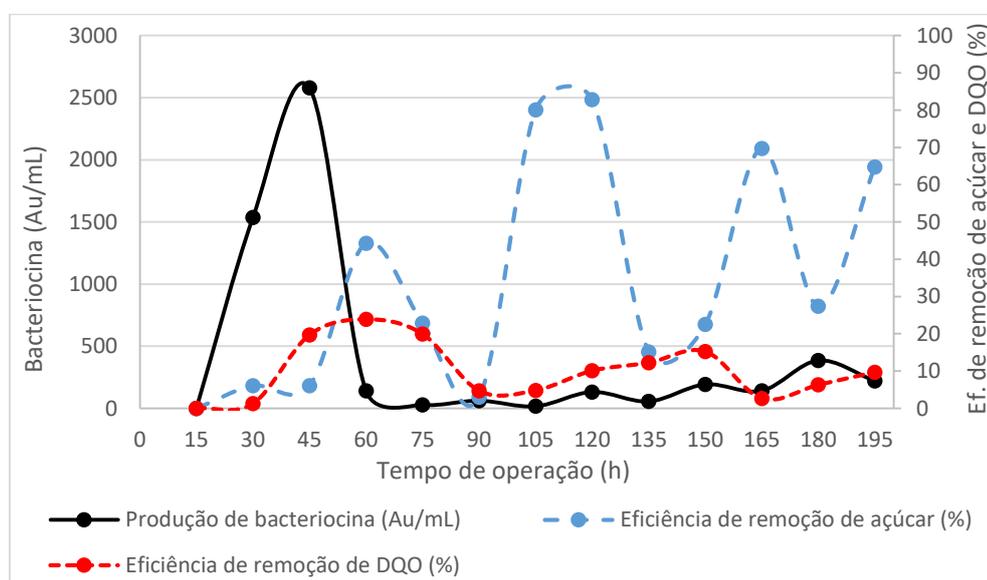


Figura 21 Produção de bacteriocinas e eficiência de remoção de DQO e de açúcares totais pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca autoclavada.

A eficiência de remoção da DQO apresentou oscilações durante o tempo de operação no reator em bateladas sequenciais, porém essa remoção de DQO ocorreu

independente dos picos de produção de bacteriocinas. A eficiência de remoção de açúcares totais durante os ciclos de fermentação apresentou oscilações que não se apresentaram associadas à produção de bacteriocinas. O aumento no consumo do açúcar pode ser decorrente da contaminação dentro do fermentador e, conseqüentemente, o crescimento de microrganismos que consumiam também a fonte de carbono disponível no meio de cultura. Ou, também, pode ser decorrente do próprio microrganismo isolado da água residuária do processamento da mandioca, que foi inoculado no reator e que, com o aumento da idade do lodo, deu preferência a outros metabólitos que não as bacteriocinas.

No gráfico da Figura 22, pode-se observar a produção de bacteriocinas e a produção de ácido lático e ácido acético, no reator em bateladas sequenciais em função do tempo de operação.

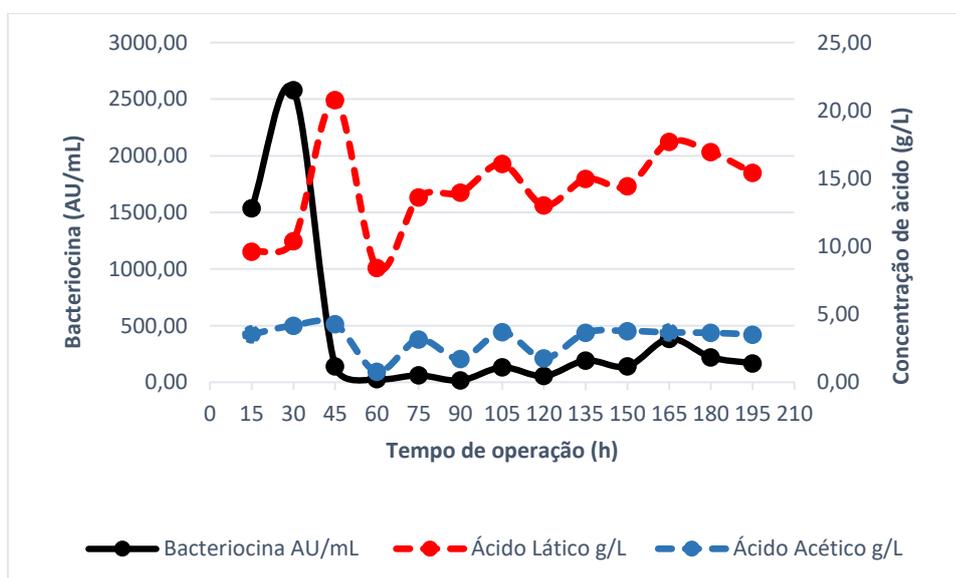


Figura 22 Curva de produção de bacteriocinas e formação de ácido lático e ácido acético pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca autoclavada.

O pico da produção de bacteriocinas ocorreu antes do pico da produção de ácido lático, o que pode ter ocorrido devido às cepas presentes no meio de cultura serem mais novas e produzirem o peptídeo primeiro, conforme vão ocorrendo os ciclos de fermentação sobre a mesma biomassa, a idade do lodo foi aumentando e então a biomassa foi perdendo ou diminuindo em muito a produção de bacteriocinas.

Este comportamento também pode ser observado na Figura 18, em que mostra a produção de bacteriocinas e do ácido lático durante a batelada realizada no delineamento experimental DCCR. Nessa condição, o maior título de bacteriocina também aparece no início 15 h e depois diminui, no entanto o ácido lático vai crescendo e se mantendo durante toda a fermentação.

Liu et al. (2004) buscaram a otimização da produção simultânea da bacteriocina nisina e ácido láctico utilizando como substrato soro de leite enriquecido e observaram que a produção simultânea dos dois compostos é possível, no entanto os valores produzidos do ácido orgânico eram baixos, não compensando a separação das substâncias, devido ao custo envolvido.

5.6.2 Produção de bacteriocinas em reator em bateladas sequenciais (AnSBR) utilizando água residuária otimizada segundo o DCCR não autoclavada

A produção de bacteriocinas realizada em escala maior em um reator em bateladas sequenciais, utilizando água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada e enriquecida segundo a otimização do delineamento experimental DCCR (item 5.5), ocorreu durante 6 ciclos de fermentação com 15 horas de duração cada ciclo, resultando em 4 dias de operação. Na Tabela 15, encontram-se os dados referentes aos valores da produção de bacteriocinas detectada pelos halos de inibição, produção de ácido láctico, produção de ácido acético, eficiência de remoção da DQO, eficiência de remoção de açúcares totais e pH final, obtidos durante a operação do reator AnSBR.

Tabela 15 Produção de bacteriocinas, produção de ácido láctico e ácido acético, eficiências de remoção de DQO e de açúcares, pH final para cada ciclo de fermentação no reator AnSBR com água residuária não autoclavada

N.º ciclo	T.O (h)	Prod. de Bact. (AU/mL)	Prod. de ác. Láctico (g/L)	Prod. de ác. Acético (g/L)	Ef. Remoção de DQO (%)	Ef. Remoção de açúcar (%)	Massa seca (g/L)	pH final
1	15	823,87	10,37	3,06	4,10	63,70	0,85	4,04
2	30	SHI	7,07	2,17	2,31	63,31	0,67	4,01
3	45	SHI	10,64	2,36	1,65	39,54	0,81	3,95
4	60	SHI	12,31	2,52	6,80	90,50	2,07	3,92
5	75	SHI	5,77	0,95	9,15	96,67	2,92	4,09
6	90	SHI	10,67	2,45	5,85	97,57	3,21	4,22

T O: tempo de operação; SHI: sem halo de inibição.

A produção de bacteriocinas ocorreu somente no primeiro ciclo (15 horas de fermentação), nos demais ciclos a formação de halo inibitório de crescimento de *L. sakei* não foi constatada, pois a expressão de bacteriocinas, se presente, não foi suficiente para inibir o crescimento da cepa indicadora.

A maior produção de ácido láctico 12,31 g/L ocorreu com 60 horas de operação e a maior produção de ácido acético ocorreu com 15 horas de operação 3,06 g/L. Foi verificado o menor pH final 3,92, justamente no mesmo ciclo em que se verificou a maior produção de ácido láctico.

Nestes ensaios realizados utilizando como meio de cultura a água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada foram observadas as maiores eficiências de remoção de açúcares totais. A eficiência de remoção da DQO manteve-se praticamente constante, com média de 4,97% durante os ciclos de fermentação testados.

Na Figura 23 está representada a produção de bacteriocinas em função do tempo de operação. Há um pico de produção no primeiro ciclo com 15 horas de fermentação de 823 Au/mL, paralisando a produção de bacteriocinas nos demais ciclos de fermentação.

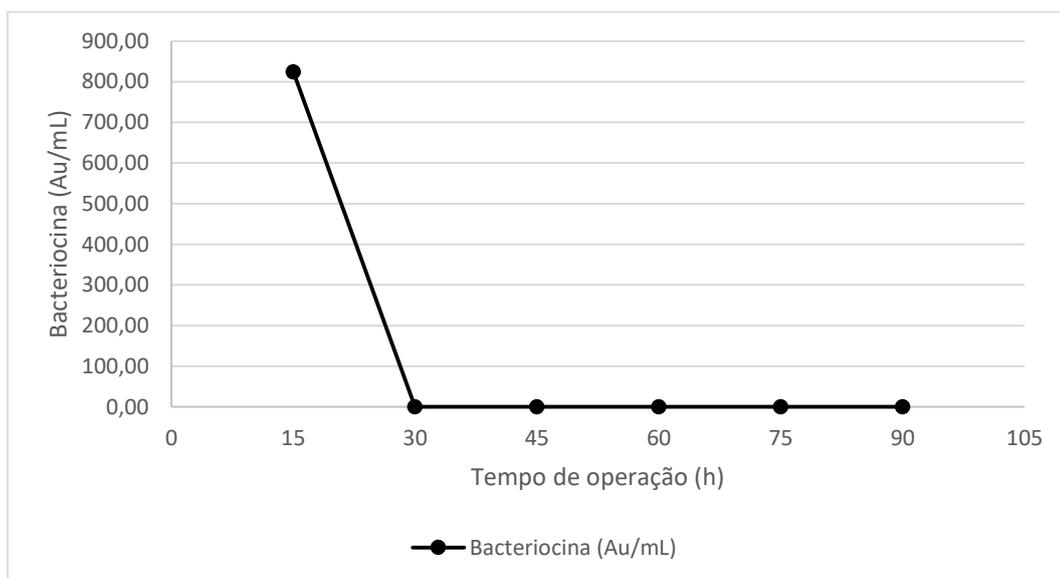


Figura 23 Produção de bacteriocinas pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada.

Na Figura 24 visualiza-se o gráfico da produção de bacteriocinas e a formação de biomassa (massa seca g/L) para cada ciclo de fermentação de 15 horas.

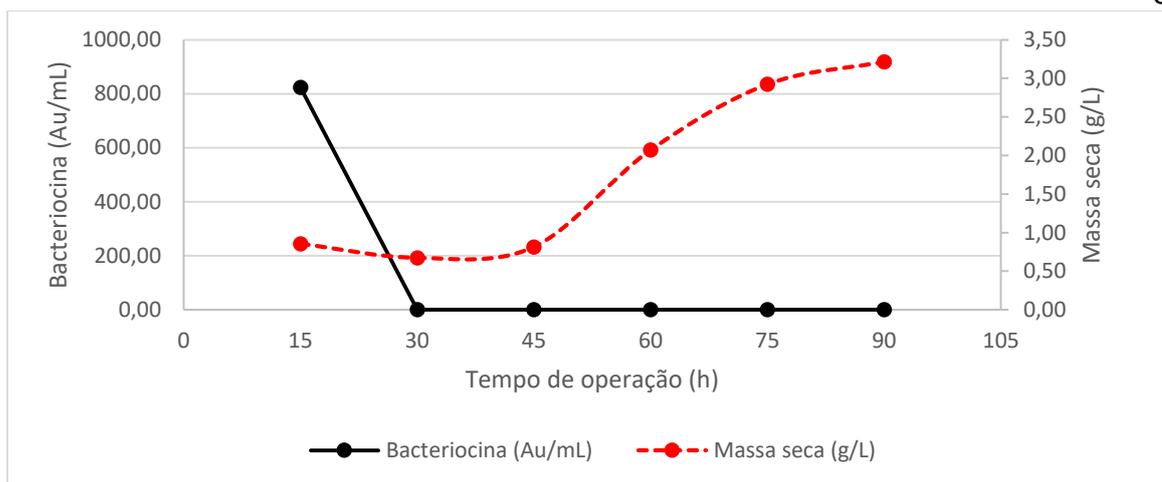


Figura 24 Curva de produção de bacteriocinas e formação de massa seca pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada.

A produção de bacteriocinas diminuiu e houve aumento na formação da biomassa. Esse aumento da biomassa pode ter ocorrido devido à competição dos microrganismos autóctones da água residuária com o *Leuconostoc mesenteroides* inoculado no reator, impedindo o seu desenvolvimento e, conseqüentemente, a formação do produto do metabolismo primário: as bacteriocinas.

Penido et al. (2018) realizaram um estudo em que foram selecionadas culturas iniciais presentes no amido de mandioca em um processo de fermentação piloto, isolando diferentes espécies de bactérias lácticas. Entre as espécies predominantes estavam *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentus* e *Lactobacillus plantarum* e em menor quantidade *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Leuconostoc mesenteroides*; entre as espécies de leveduras foram isolados *Pichia scutulata*, *Candida humilis*, *Candida etanolia* entre outras. Os autores relataram ainda que o crescimento de bactérias lácticas é estimulado pela presença de leveduras, que fornecem fatores de crescimento como vitaminas e compostos nitrogenados.

No gráfico da Figura 25, visualiza-se o resultado da produção de bacteriocinas em água residuária não autoclavada otimizada, a eficiência de remoção de DQO e de açúcares totais, em função do tempo de operação do reator AnSBR.

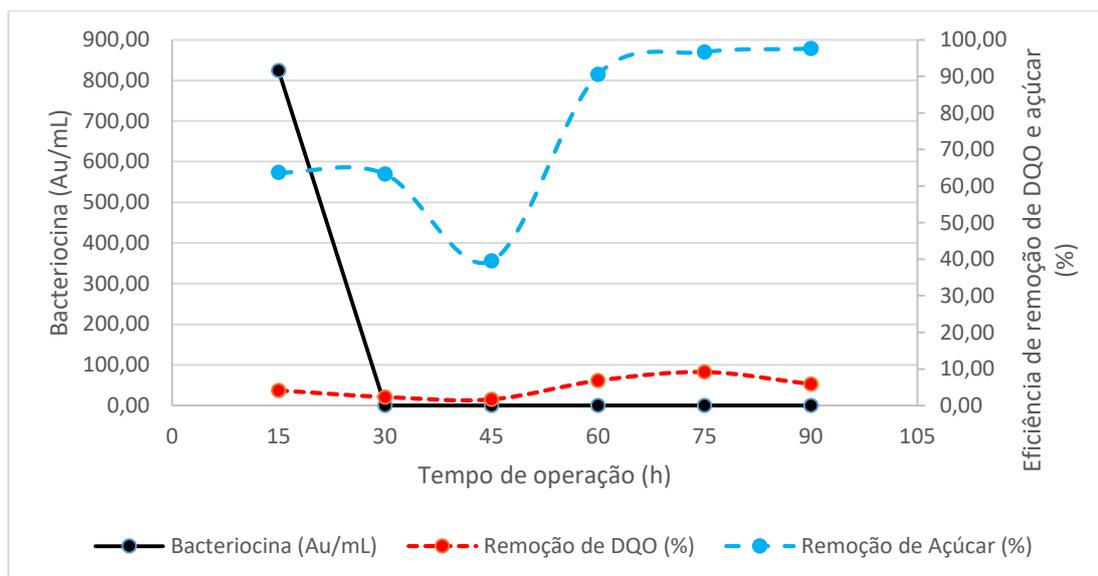


Figura 25 Produção de bacteriocinas e eficiência de remoção de DQO e açúcares totais pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* no reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada.

Embora a produção de bacteriocinas tenha sido observada somente no primeiro ciclo de fermentação, houve aumento no consumo dos açúcares ao longo da operação do reator, que deve ser decorrente da competição entre os microrganismos autóctones da água residuária e o *Leuconostoc mesenteroides*, conforme já descrito. A eficiência de remoção de DQO manteve-se constante, com média de 4,97%.

Não houve melhora na eficiência de remoção da DQO nas fermentações realizadas no reator AnSBR (Figuras 21 e 25), comparativamente com as fermentações realizadas em frascos na etapa do DCCR (Figura 17). A remoção de DQO se manteve baixa nos dois modos de fermentação, pois a bactéria presente era a mesma *Leuconostoc mesenteroides* e a matéria orgânica convertida em ácido lático, ácido acético e CO₂, que são produtos do metabolismo intermediário, permanecem no efluente da fermentação, contribuindo assim para a DQO.

Na Figura 26 observa-se a produção de bacteriocinas e a produção de ácido lático e ácido acético, em reator AnSBBR utilizando como substrato água residuária da indústria de mandioca não autoclavada e enriquecida segundo o DCCR (item 5.5).

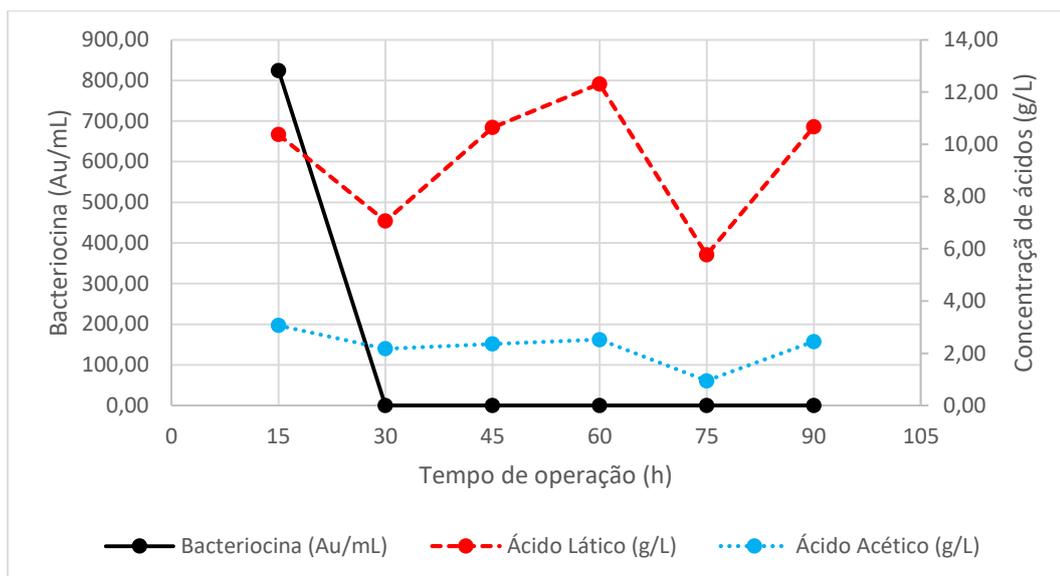


Figura 26 Produção de bacteriocinas e formação de ácido láctico e ácido acético pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* em reator AnSBR utilizando como substrato água residuária da indústria de fécula de mandioca não autoclavada.

A queda da produção de bacteriocinas não alterou as produções do ácido láctico e do ácido acético. A maior produção dos ácidos orgânicos ocorrem com 60 horas de operação, e a produção foi de 12,31 g/L para o ácido láctico e 2,52 g/L para o ácido acético (Tabela 13), após esse período, ocorreu oscilação na produção dos ácidos orgânicos.

Comparando-se os substratos utilizados na fermentação em bateladas sequenciais, água residuária autoclavada e não autoclavada, observou-se que houve queda nos títulos de bacteriocinas e na formação dos ácidos orgânicos, quando utilizada a água residuária não autoclavada. Esse fato pode ter ocorrido porque quando foi utilizado o substrato autoclavado no reator em bateladas sequenciais estavam presentes somente as BAL *Leuconostoc mesenteroides*, porém no outro substrato havia a presença de vários microrganismos diferentes, presentes naturalmente na biota da água residuária.

Tanto no processo de fermentação em reator em batelada sequencial (Figura 25 e Figura 26) quanto no processo de fermentação utilizando frascos agitados em *shaker* (Figura 21), a produção de ácidos orgânicos foi semelhante, portanto, as diferentes formas de fermentação não alteraram a formação do ácido láctico e ácido acético. Esta observação é semelhante à realizada por Malvido, González e Guerra (2016), considerando seu estudo em que foi testada a produção da bacteriocina nisina, em fermentações em bateladas utilizando soro de leite suplementado com concentrações diferentes de glicose e fermentações descontínuas utilizando soro de leite não suplementado. Os autores verificaram também que as concentrações de ácido láctico e ácido acético foram semelhantes nas duas formas de fermentações testadas.

6 CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos e a metodologia adotada para esta pesquisa é possível concluir que:

- Foi possível isolar bactérias láticas com potencial de produção de bacteriocinas de resíduos do processamento da mandioca. A bactéria lática isolada e utilizada nos ensaios foi identificada como *Leuconostoc mesenteroides*.
- No delineamento Plackett Burman os fatores sacarose, extrato de levedura e sulfato de magnésio apresentaram efeitos significativos na produção de bacteriocinas, a partir de água residuária de indústria de fécula de mandioca, utilizando a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* isolada.
- A condição ótima, definida no delineamento experimental composto central rotacional, para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides* foi: água residuária de fecularia de mandioca suplementada com 18,7 g/L de sacarose, 14,6 g/L de extrato de levedura e 1,3 g/L de sulfato de magnésio.
- Para a mesma condição do substrato, os ensaios realizados em reator em bateladas sequenciais apresentaram produção de bacteriocinas 56,76% maior do que a obtida nos ensaios realizados em frascos com agitação em *shake*.
- A produção de bacteriocinas no reator em bateladas sequencias com água residuária de fecularia otimizada não autoclavada se mostrou inviável, devido à competição entre os microrganismos autóctones da água residuária com o inóculo de *Leuconostoc mesenteroides*, que promoveu a paralisação da produção do metabólito de interesse, após o segundo ciclo de fermentação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a relevância do aproveitamento de águas residuárias e os resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se projetar uma continuidade dos estudos que busque:

- Isolar outras bactérias produtoras de bacteriocinas da água residuária de fecularia, como por exemplo, o *Lactococcus lactis*, que é o produtor da bacteriocina mais conhecida e estudada, a nisina.
- Testar outros fatores para tentar melhorar a produção de bacteriocina utilizando como substrato a água residuária da indústria de fécula de mandioca, como, por exemplo, o tempo de fermentação que pode variar para cada cepa produtora de bacteriocinas.
- Controlar o pH do meio de fermentação na faixa adequada para a produção de bacteriocinas.
- Verificar se a produção de bacteriocinas melhora em processos de fermentação contínua utilizando biomassa imobilizada, para manter altas taxas de crescimento microbiano, melhorando dessa forma a produção de bacteriocinas.

REFERÊNCIAS

- ADEKUNLE, A.; ORSAT, V.; RAGHAVAN, V. Lignocellulosic bioethanol: A review and design conceptualization study of production from cassava peels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 518–530, 2016.
- ADETUNJIA, A. I.; CLOUB, du H.; WALFORDB, S.N.; TAYLORA, J. R.N. Complementary effects of cell wall degrading enzymes together with lactic acid fermentation on cassava tuber cell wall breakdown. **Journal Industrial Crops and Products**, v. 90, p. 110–117, 2016.
- AKTYPIS, A.; TYCHOWSKI, M.; KALANTZOPOULOS, G.; AGGELIS, G. Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation. **Springer Science Business Media**, v. 92, p. 207–220, 2007.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION - AWWA; WPCF - **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: Association, American Public Health, 2005.
- AMIALI, M.N.; LACROIX, C.; SIMARD, R.E. High nisin Z production by *Lactococcus lactis* ul719 in whey permeate with aeration. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 887-894, 1998.
- ANDREANI, C. L.; TONELLO, T. U.; MARI, A. G.; LEITE, L. C.C.; CAMPANÃ, H.D; LOPES, D.D.; RODRIGUES, J. A. D.; GOMES, S. D. Impact of operational conditions on development of the hydrogen-producing microbial consortium in an AnSBBR from cassava wastewater rich in lactic acid. **International journal of hydrogen energy**, v. 44, p. 1474-1482, 2019.
- ANDREANI, C. L.; TORRES, D. G. B.; SCHULTZ, L.; CARVALHO, K. Q.; GOMES, S. D. Hydrogen production from cassava processing wastewater in an anaerobic fixed bed reactor with bamboo as a support material. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal - SP, v.35, n.3, p. 578-587, 2015.
- AROTUPIN D.J. Evaluation of microorganisms from Cassava wastewater for production of Amylase and cellulose. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, p. 475-480, 2007.
- BERNARDO, M. P.; COELHO, L. F.; de LIMA C. J. B.; RODOVALHO, C. M.; OLIVEIRA, P. M.; PAULA, F. C.; CONTIERO, J. Isolation and characterization of bacterial producers of optically pure D (-) and L (+) lactic acid. **African Journal of Microbiology Research**, v. 21, p. 2618-2628, 2013.
- CABO, M. L.; MURADO, M. A.; GONZALEZ, P.; Pastoriza, L. Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 264–273, 2001.
- CAMARGO, R. J. **Ação de bacteriocinas de bactérias Lácticas no controle de *Listeria Monocytogenese* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada**. Tese de doutorado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, 2011.
- CHAMPAGNE, C. O.; GARDNER, N. J. Effect of process parameters on the production and drying *Leuconostoc mesenteroides* cultures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 291 – 296, 2002.

CHANDRAPATI, S.; O'SULLIVAN, D. J. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Journal of Biotechnology**, v. 63, p. 229–233, 1998.

CHEIGH, C.; CHOI, H.; PARK, H.; KIM, S.; KOOK, M.; KIM, T.; HWANG, J.; PYUN, Y. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* a164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology**, v. 95, p. 225–235, 2002.

CHIKINDAS, M. L.; WEEKS, R.; DRIDER, D.; CHISTYAKOV, V. A.; LEON MT DICKS, L. M.T. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23–28, 2018.

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

COELHO, L. F. **Isolamento e seleção de micro-organismos e desenvolvimento de tecnologia para produção de ácido láctico**. 2011. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2011.

DABA, H.; LACROIX, C.; HUANG, J.; SIMARD R. E. Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*, **Applied Microbiology Biotechnology**, v.39, p.166-173, 1993.

DABA, H.; PANDIAN, S.; GOSSELIN, J. F.; SIMARD, R. E.; HUANG, J.; LACROIX C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3450-3455, 1991.

DERRINGER, G. C.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several responses variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; NASIS, P.; GALIOTOU, M.; METAXOPOULOS J. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1314–1323, 2005.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J. Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, v. 74, p.690–696, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination sugars and related substance. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 21th. American Public Health Association. 2005. 1600 p.

EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros>> Acesso em 20 de dez 2018.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class Ila bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 85-106, 2000.

FLEURY, Y.; DAYEM, M. A.; MONTAGNE, J. J.; CHABOISSEAU, E.; LE CAER, J. P.; NICOLAS, P.; DELFOUR, A. covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin y 10537, a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n.24, p. 14421–14429, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. (1997). Disponível em: < <http://www.fao.org/3/w5146e/w5146e08.htm#starchy%20foods>> Acessado em: 10/4/2018.

FURUTA, Y.; MARUOKA, N.; NAKAMURA, A.; OMORI, T.; SONOMOTO, K. Utilization of fermented barley extract obtained from a by-product of barley shochu for nisin production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, p. 393–397, 2008.

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MANUNGA, T.; GOMES, P. C. F. de L.; ZAIAT, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. **International journal of hydrogen energy**, v. 41, p. 8120-8131, 2016.

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; PENTEADO, E. D.; LUCAS S. D. M.; GOTARDO, J. T.; ZAIAT, M. The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific organic loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. **Journal Bioresource Technology**, v.197, p. 201–207, 2015.

GREASHAM, L. R.; HERBER, K.W. Design and optimization of growth media. In: Rhodes PM, Stanbury PF, eds. **Applied Microbial Physiology**, 1st edn. New York: Oxford University Press, 1997.

GROSS, E.; MORELL, J. L. The structure of nisin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 4634-4635, 1971.

GUERRA, N. P.; RUA, M. L.; PASTRANA, L. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 267–281, 2001.

HÉCHARD, Y.; BERJEAUD, J.M.; CENATIEMPO Y. Characterization of the *mesB* Gene and Expression of Bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. **International journal current microbiology**, v. 39, p. 265–269, 1999.

HEMME, D.; SCHEUNEMANN, C. F. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **Journal International Dairy**, v. 14, p. 467–494, 2004.

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

INOUE, R. K. **Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento na produção de biohidrogênio em ANSBBR com agitação tratando água residuária sintética**. 2013. 221 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento, São Carlos – SP, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. 2009. Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoadevida>. Acessado em: 5/5/2019.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERÔNIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato

intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília – DF, v.43, n.9, p.1201-1207, 2008.

JOZALA, A. F.; NOVAES, L. C. de L.; CHOLEWA, O.; PENNA, T. C. V. Increase of Nisin Produced by *Lactococcus lactis* in Different Media Through the Five Transfers. **African Journal of Biotechnology**, v. 4 (3), p. 262-265, 2005.

KIM, W. S.; HALL, R. J.; DUNN, N. W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology Biotechnol**, v. 48, p.449-453, 1997.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria. **FEMS Microbiology letter journal cover**, v. 12, p. 39–86, 1993.

KOSTINEK, M.; SPECHT, I.; EDWARD, V.A.; PINTO, C.; EGOUNLETY, M.; SOSSA, C.; MBUGUA, S.; DORTU, C.; THONART, P.; TALJAARD, L.; MENGU, M.; FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures International. **Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 342–351 2007.

KRUGER, M. F.; BARBOSA. M. S.; MIRANDA, A. LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. Isolation of bacteriocinogenic strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and evidences of production of a variant of nisin with modification in the leader-peptide. **Food Control**, v. 33, p. 467-476, 2013.

KURIA, P.; ILYASC, M.; ATEKAA, E.; MIANOD, D.; ONGUSOA, J.; CARRINGTONC, J. C.; TAYLORC, N. J. Differential response of cassava genotypes to infection by cassavamosaic geminiviruses. **Journal Virus Research**, v. 227, p. 69–81, 2017.

KWAADSTENIET, M.; DOESCHATE, K.; DICKS, L. M T. Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, p. 547–549, 2008.

LAZARO, C. Z.; VICH, D. V.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototropic microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 11691-11700, 2012.

LEÃES, F.L.; VANIN, N.V; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Use of Byproducts of Food Industry for Production of Antimicrobial Activity by *Bacillus* sp. P11. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 822–828, 2011.

LEITE, A. L. M. P.; ZANON, C. D.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from cassavaroot bagasse and peelings. **Carbohydrate Polymers** 2016.

LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p.145 – 150, 1991.

LIANG, S.; MCDONALD, A. G.; COATS, E. R. Lactic acid production from potato peel waste by anaerobic sequencing batch fermentation using undefined mixed culture. **Waste Management**, v. 45, p. 51-56, 2015.

LIU, C.; LIU, Y. A.; LIAO, W.; WEN, Z.; CHEN S. Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from whey. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 877–882, 2003.

LIU, C.; LIU, Y. A.; LIAO, W.; WEN, Z.; CHEN S. Simultaneous Production of Nisin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113-116, p. 627-638, 2004.

LOSTEINKIT, C.; UCHUYAMA, K.; OCHI, S.; TAKAOKA, T.; NAGAHISA, K.; SHIOYA, S. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faesium* and cloning of the related genes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 4, p. 390-395, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK D. P. Diversidade metabólica: catabolismo de compostos orgânicos. In: MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. 12^o ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 21.

MAFIAH, A.; RENAULT, I. D.; VIGNOLES, C.; HECHARD, Y.; BRESSOLLIER, P.; RATINAUD, M. H.; CENATIEMPO, Y.; JULIEN R. Membrane Permeabilization of *Listeria monocytogenes* and Mitochondria by the Bacteriocin Mesentericin Y105. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n.10, p. 3232-3235,1993.

MALHEIROS, P. S.; SANT'ANNA, V.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2^a. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n.1, p. 825-834, 2015.

MALVIDO, M.C.; GONZÁLEZ, E. A.; GUERRA, N. P. Nisin production in realcalized fed-batch cultures in whey with feeding with lactose- or glucose-containing substrates. **Applied Microbiology Biotechnol**, v. 100, p. 7899–7908, 2016.

MANSSOURI, E. M. **Influência da carga orgânica na produção de biohidrogênio em ASBBR com agitação tratando água residuária sintética**. 2012. 209 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento, São Carlos - SP, 2012.

MASUDA, Y.; ONO, H.; KITAGAWA, H.; ITO, H.; MU, F.; SAWA, N.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. A novel cyclic bacteriocin, leucocyclicin Q. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011.

MATHIEU, F.; SUWANDHL, I. S.; REKHIF, N.; MILLIERE, J.B.; LEFEBVRE G. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Mesenteroides* FR 52 **Journal of Applied Bacteriology**,

MATSUSAKI, H.; ENDO, N.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* 10-1:relationship between production of the lantibiotic and lactate, and cell growth App. **Microbiol Biotechnol**, v. 45, p.36-40, 1996.

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**. v.143, p.87-890, 1992.

METSOVITI, M.; PARAMITHIOTIS, S.; DROSINOS, E. H.; SKANDAMIS, P. N.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; PAPANIKOLAOU S. Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **New Biotechnology**, v. 28, p.1871-6784, 2011.

MORACAMIN, S. V.; TURUBATOVIC, L.; MARIJA SKRINJAR, M.; OBRADOVIC, D. Antilisterial activity of bacteriocin isolated from *Leuconostoc mesenteroides* ssp.

mesenteroides IMAU:10231 in the production of sremska sausages: lactic acid bacteria isolation, bacteriocin identification and meat application experiments. **Food Technology Biotechnol**, v. 51, n. 2, p. 247–256, 2013.

MOSHI, A. P.; TEMU, S. G.; NGES, I. A.; MALMO, G.; HOSEA, K. M. M.; ELISANTE, E.; MATTIASSON, B. Combined production of bioethanol and biogas from peels of wild cassava *Manihot glaziovii*. **Journal Chemical Engineering**, v. 279, p. 297–306, 2015.

MULDERS, J. W. M.; BOERTGTER, I. J.; ROLLEMA, H. S.; SIEZEN, R. J.; de VOS, W. M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **European Journal Biochemistry**, v.201, p. 581–584, 1991.

NAGHMOUCHI, K.; FLISS, I.; DRIDER, D.; LACROIX, C. Pediocin PA-1 production during repeated-cycle batch culture of immobilized pediococcus acidilactici ul5 cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 5, p. 513–517, 2008.

NES, I. F.; DIEP, D. B. HAVARSTEIN, L. S.; BRURBERG, M. B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Kluwer Academic Publishers**, v. 70, p. 113-128, 1996.

NEYSENS, P.; MESSENS, W.; VUYST, L. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 29–39, 2003.

NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.

NOIKE, T.; TAKABATAKE, H.; MIZUNO, O.; OHBA, M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **Journal Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1367-71, 2002.

NOONPAKDEE, W.; SANTIVARANGKNA, C.; JUMRIANGRIT, P.; SONOMOTO, K.; PANYIM, S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**. v. 81, p.137– 145, 2003.

O'CONNOR, P.M.; O'SHEA, E.F.; GUINANE, C. M.; O'SULLIVAN, O.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Nisin H is a new nisin variant produced by the gutderived strain *Streptococcus hyointestinalis*. **Applied Environ Microbiology**, v. 81, n.12, p. 3953–3960, 2015.

OBADINA, A.O.; OYEWOLE, O.B.; SANNI, L. O.; ABIOLA S. S. Fungal enrichment of cassava peels proteins. **African Journal of Biotechnology** Vol. 5 (3), p. 302-304, 2006.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais da bacteriocinas. **Brazilian Journal and Food Tecnology**, Campinas – SP, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.

OLIVEIRA, M.A.; REIS, E.M.; NOZAKI, J. Biological Treatment of wastewater from the cassava meal industry. **Environmental research section A**. v. 85, p. 177-183, 2001.

ÖZEL, B.; ŞİMŞEK, O.; AKÇELİK, M.; SARIS, P. E. J. Innovative approaches to nisin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v, 102, n. 15, p. 6299-6307. Aug. 2018.

PALMA, D. FERNANDES, J. P.; CEREDA, M. P.; GOMES, S. D. Dolomitic limestone as an alkalizing agent for treating cassava starch wastewater in an anaerobic reactor. **Revista Ceres**, Viçosa – MG, v. 65, n.5, p. 388-394, 2018.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava Bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74 p. 81-87, 2000.

PAPAGIANNI, M.; AVRAMIDIS, N.; FILIOUSIS, G. Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1557–1563, 2007.

PAPATHANASOPOULOS, M. A.; KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; LEFEBVRE, G.; LE CAER, J. P.; HOLY, A. V.; HASTINGS, J. W. Multiple Bacteriocin Production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and Other *Leuconostoc/Weissella* Strains. **Journal International Current Microbiology**, v. 35, p. 331–335, 1997.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p. 628-638, 1999.

PAULA, A. T.; CENEVIVA, A. B. J.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G.M.; CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X.; PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A Bacteriocinogenic Strain Isolated from Brazilian Water Buffalo Mozzarella. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, p.186–197, 2014.

PENIDO, F. C. L.; PILÓ, F.B.; SANDES, S. H. de C.; NUNES, A. C.; COLEN, G.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; ALVES LACERD I. C. A. Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. **Journal Basilian the Microbiology**, v. 4 9, p.823–831, 2 0 1 8.

PENTEADO, E. D. LAZARO, C.Z., SAKAMOTO, I.K., ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen Production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 6137-6145, 2013.

PEREZ, R. H.; HIMENO, K.; ISHIBASHI, N.; MASUDA, Y.; ZENDO, T.;FUJITA, K.; WILAI PUN, P.; LEELAWATCHARAMAS, V.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Monitoring of the multiple bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 through a developed liquid chromatography and mass spectrometry-based quantification system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114 n. 5, p. 490-496, 2012.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; PAREJA, M.; AMBROGI B. G. Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry**, v. 130, p. 10-21, 2016.

PONGTHARANGKUL, T.; DEMIRCI, A. Evaluation of Culture Medium for Nisin Production in a Repeated-Batch Biofilm Reactor. **Biotechnology Progress** v.22, p. 217-224. 2006.

RAMU, R.; SHIRAHATTI, P. S.; DEVI, A. T.; PRASAD, A.; KUMUDA J., LOCHANA M. S.; ZAMEER F.; DHANANJAYA B. L.; NAGENDRA PRASAD M. N. Bacteriocins and their applications in food preservation. **Journal Food Science and Nutrition**, p. 1549-7852, 2015.

RANVEER, R.C.; SURE, K.P.; KOTNIS, P.V.; BAGWAT, P. K.; DANDGE, P.B.; SAKKO, A. K. Production and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus*

Viridescence(NICM 2167). **Journal Brazilian Archives of Biology and Technologia**, v. 59, p. 1-7, 2016.

REVOL-JUNELLES, A.M.; MATHIS, R.; KRIER, F.; FLEURY, Y.; DELFOUR A.; LEFEBVRE G. *Leuconostoc mesenteroides* su bsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p. 120-124, 1996.

RODRIGUEZ, J.M.; CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HORN, N.; DODD, H. M., HERNANDEZ, P. E. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p.109-115, 1995.

SCHNEIDER, N.; WERKMEISTER, K.; PISCHETSRIEDER M. Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. **Food Chemistry**, v. 127, p. 847–854, 2011.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. BACTERIOCINAS: Mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara – SP, v.14, n.2, p. 229-235, 2003.

SHI, C.; ZHANG, X.; ZHAO, X.; MENG, R.; LIU, Z.; CHEN, X.; GUO, N. Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. **Journal Food Control**, v. 71 p. 10-16, 2017.

SIKORA, A.; BŁASZCZYK, M.; JURKOWSKI, M.; ZIELENKIEWICZ, U. **Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia**: on purpose or by coincidence? In *Lactic Acid Bacteria R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. 2013. p. 487-515.

SIMSEK, O.; COM, A. H.; AKKOÇ, N.; SARIS, P. E. J.; AKÇELIK, M. Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered *Lactococcus lactis* strains. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 481–490, 2009.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Journal Biochemical Engineering**, v. 13, p. 205–218, 2003.

STILES, M. E. Bacteriocins produced by *leuconostoc* species. In.: DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Nova Iorque: Blackie Academic & Professional, 1994.p.497—505.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 1-29, 1997.

THUNELL, R. K. Symposium: the dairy *Leuconostocs* taxonomy of the *Leuconostocs*. **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 2514-2522, 1995.

TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 40, p. 209–221, 2009.

TORRES, D. G. B.; LUCAS, S. D. M.; ANDREANI, C. L.; CARVALHO, K. Q.; COELHO, S. R. M.; GOMES, S. D. Hydrogen production and performance of anaerobic fixed-bed reactors using three support arrangements from cassava starch wastewater. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal - SP, v. 37, n. 1, p. 160-172, 2017.

WANG, M.; GAO, Z.; YONGGUANG ZHANG, Y.; PAN, L. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.13, p. 5691-701, 2016.

WIRAWAN, R.E.; KLESSE, N. A.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. **Applied Environ Microbiology**, v. 72, p.1148–1156, 2006.

XIRAPHI, N.; GEORGALAKI, M.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; TSAKALIDOU, E.; DROSINOS, E.H. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, v. 80, p. 194–203, 2008.

ZACHAROF, M.P.; LOVITT, R.W. Investigation of shelf life of potency and activity of the Lactobacilli produced bacteriocins through their exposure to various physicochemical stress factors. **Probiotics Antimicrobial Proteins**, v. 4, p. 187-97, 2012.

ZENDO, T.; FUKAO, M.; UEDA, K.; HIGUCHI, T.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 67, p. 1616–1619, 2003.

ZENDO, T.; NAKAYAMA, J.; FUJITA, K.; SONOMOTO, K. Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. **Applied Microbiology**, v.104, p. 499-507, 2007.

ZHANG, M.; XIE, L.; YIN, Z.; KHANAL, S. K.; ZHOU, Q. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. **Journal Bioresource Technology**, p. 50–62, 2016.

ZHOU, X. X.; PAN, Y.J.; WANG, Y. B.; LI, W. F. Optimization of medium composition for nisin fermentation with response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 245-249, 2008.

ANEXO

ANEXO A RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS



Neo 10001334/2018

Neo 10001334/2018

AMOSTRA	180711337726
Descrição:	bactéria isolada de manipueira
Data do recebimento da amostra:	8 de Agosto de 2018
Data de liberação do resultado:	29 de Agosto de 2018

Análise de sequenciamento do marcador genético rDNA 16S (V3-V4) - BACTÉRIAS	Sequências	Porcentagens
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14314	100,0%



Neo 10001334/2018

INFORMAÇÕES ADICIONAIS AO ENSAIO

ENSAIO	PROCEDIMENTO
Identificação de micro-organismos por sequenciamento de DNA	LABGEM-PE-023 - Procedimento para Diagnóstico Microbiológico Digital

- Nota 1: Os resultados referem-se somente aos itens ensaiados
- Nota 2: Este Relatório de Ensaio só pode ser reproduzido por completo

Luiz Felipe de Oliveira, PHD
CRBio-03 nº 81466/03-D
CEO
Florianópolis, 29/08/2018