

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM
ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA**

ARUANI LETÍCIA DA SILVA TOMOTO

CASCAVEL – PR

FEVEREIRO 2020

ARUANI LETÍCIA DA SILVA TOMOTO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM
ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento aos requisitos à obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração de recursos Hídricos e Saneamento ambiental.

Orientador: Profa. Dra. Simone Damasceno Gomes

CASCADEL – PR

FEVEREIRO 2020

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

Tomoto, Aruani Leticia da Silva
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS
LÁTICAS EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE
MANDIOCA / Aruani Leticia da Silva Tomoto;
orientador(a), Simone Damasceno Gomes, 2020.
117 f.

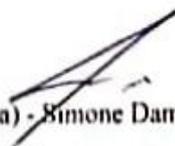
Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, 2020.

1. Bacteriocinas. 2. Bactérias lácticas. 3. Água residuária da fécula de mandioca. I. Damasceno Gomes, Simone. II. Título.

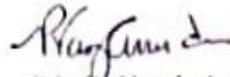
ARUANI LETÍCIA DA SILVA TOMOTO

Otimização da produção de bacteriocinas de bactérias do ácido lático em água residuária da indústria de fécula de mandioca

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra 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)



Priscila Vaz de Arruda

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Montserrat Calderón

ITT – Tepic-Nayarit/México


Luciane Sene

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

Cascavel, 17 de fevereiro de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Yoshio e Maria, que sempre fizeram tudo que era possível para me apoiar e incentivar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso pai, pelo dom da vida e por ter me guiado durante o curso de pós-graduação em Engenharia Agrícola;

Ao meu pai, Yoshio, minha mãe, Maria, meus irmãos, Ângela e Fernando, e meus sobrinhos, Paulo, Lincoln, Miguel e Lorena, pelo apoio, incentivo e amor incondicional;

Ao Fernando, pelo carinho, companheirismo, apoio e compreensão nos momentos de ausência;

À minha orientadora, Profa Dra. Simone Damasceno Gomes, pela orientação, apoio no desenvolvimento do trabalho, exemplo de profissionalismo e dedicação, enorme contribuição para o meu aprendizado dentro e fora da universidade;

À instituição de ensino Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade de aprendizado gratuito e de qualidade;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI), pelos ensinamentos transmitidos que edificaram a minha formação acadêmica e profissional;

Ao Laboratório de Saneamento, seus integrantes e amigos, que sempre tiveram a disposição de colaborar em todas as etapas de realização da pesquisa;

Aos técnicos Edison e Euro, pela confiança, ajuda e pela enorme paciência;

Finalmente, a todos aqueles que contribuíram para a realização deste projeto.

BIOGRAFIA

Aruani Letícia da Silva Tomoto, nascida em 05 de janeiro de 1993 na cidade de Guarulhos – SP. Engenheira Ambiental formada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus de Campo Mourão, PR. Participou do Programa Ciências sem Fronteiras como bolsista pela CAPES, tendo estudado um ano da Laurea in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio no Politecnico di Torino – Itália. Desenvolveu projeto de Iniciação Científica na área de Tratamentos de águas de abastecimento e residuárias na graduação e possui experiência como estagiária na mesma área pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Suínos e Aves (EMBRAPA). Atualmente é discente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola na linha de pesquisa de Saneamento pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Campus Cascavel, PR, sob orientação da professora Dra. Simone Gomes Damasceno.

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

RESUMO GERAL

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos a partir de bactérias lácticas, que agem contra bactérias patogênicas, podendo ser utilizadas como biopreservantes nos alimentos. Os resíduos do processamento da mandioca normalmente estão associados com a presença de bactérias lácticas, podendo assim ser utilizados como substratos para o isolamento de bactérias lácticas e como meio de cultivo para a produção de bacteriocinas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de bacteriocinas em água residuária de indústria de fécula de mandioca, por bactérias lácticas isoladas do próprio resíduo do processamento da mandioca. Inicialmente, foi feito o isolamento de uma bactéria láctica a partir do resíduo líquido da indústria de farinha de mandioca, e então avaliado seu potencial para a produção de bacteriocinas. Juntamente com a cepa de bactéria láctica isolada no presente trabalho, utilizou-se também uma cepa de *Leuconostoc mesenteroides*, já isolada do mesmo resíduo e que apresentava capacidade comprovada de produção de bacteriocinas. A identificação da cepa isolada foi realizada por testes morfológicos, bioquímicos e por sequenciamento genético 16S (V3-V4), sendo identificada como *Lactobacillus fermentum*, com homologia de 99,48%. Para selecionar os fatores que influenciavam nas produções de bacteriocinas por *L. mesenteroides* e *L. fermentum* foram realizados delineamentos experimentais do tipo Plackett-Burman (PB), com 5 fatores (sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e Tween 80), com tempo de incubação de 36 horas, a 30 °C e agitação de 100 rpm. Os fatores significativos no PB a 90%, para ambas as cepas, foram: sacarose, extrato de levedura e Tween 80. Na sequência, foram realizados ensaios cinéticos para ambas as cepas, no tempo total de 35 h, com amostras retiradas a cada 5 h, para identificar o melhor tempo de fermentação para a produção de bacteriocinas. As duas cepas apresentaram a maior produção em 20 h de cultivo. Definidos os fatores significativos do PB para a produção de bacteriocinas e o melhor tempo de fermentação, foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para as cepas de *L. fermentum* e *L. mesenteroides*, a fim de otimizar a produção de bacteriocinas. Os fatores para o DCCR foram: sacarose, extrato de levedura e Tween 80, tempo de fermentação de 20 horas, temperatura de 30 °C e agitação de 100 rpm. Nos ensaios do DCCR foram avaliadas as superfícies de respostas e os efeitos significativos das variáveis independentes sobre a variável dependente (produção de bacteriocinas), para estabelecer um modelo estatístico para otimizar o processo. Os resultados indicaram que as melhores produções de bacteriocinas para *L. fermentum* e *L. mesenteroides* foram de 11751,03 e 3693,34 AU/mL, respectivamente. Por último foi avaliada a cocultura das duas cepas; no entanto, a produção de bacteriocinas diminuiu, demonstrando que as cepas de *L. fermentum* e *L. mesenteroides* apresentaram incompatibilidade.

Palavra-Chave: *Leuconostoc mesenteroides*; *Lactobacillus fermentum*; bactérias do ácido láctico; bacteriocinas; resíduos agroindustriais.

OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION OF BACTERIOCINES FROM LACTIC BACTERIA IN WASTEWATER FROM CASSAVA STARCH INDUSTRY

ABSTRACT

Bacteriocins are antimicrobial peptides produced from lactic acid bacteria, which act against pathogenic bacteria and can be used as biopreservatives in food. Residues from cassava processing are usually associated with the presence of lactic acid bacteria, and can be used as a substrate for the isolation of lactic acid bacteria and as a culture medium for the production of bacteriocins. In this sense, the objective of this work was to optimize the production of bacteriocins in wastewater from the cassava starch industry, by lactic acid bacteria isolated from the residue of the cassava processing. Initially, a lactic acid bacteria was isolated from the liquid residue of the cassava flour industry, and then its potential for the production of bacteriocins was evaluated. Along with the strain of lactic bacteria isolated in the present work, a strain of *Leuconostoc mesenteroides* was also used, already isolated from the same residue and with proven bacteriocin production capacity. The isolated strain was identified by morphological and biochemical tests and by 16S genetic sequencing (V3-V4), being identified as *Lactobacillus fermentum*, with 99.48% homology. To select the factors that influenced the production of bacteriocins by *L. mesenteroides* and *L. fermentum*, experimental designs of the Plackett-Burman (PB) were carried out, with 5 factors (sucrose, yeast extract, potassium phosphate, magnesium sulfate, and Tween 80), with an incubation time of 36 hours, at 30 °C, and agitation of 100 rpm. The factors defined in the PB in 90%, for both strains, were: sucrose, yeast extract, and Tween 80. Then, kinetic tests were performed for both strains, in the total time of 35 h, with samples taken every 5 h, to identify the best fermentation time for the production of bacteriocins. Both strains showed the highest production in 20 hours of cultivation. Having defined the significant factors of PB for the production of bacteriocins and the best fermentation time, the Central Rotational Composite Design (CRCD) was performed for the strains of *L. fermentum* and *L. mesenteroides*, in order to optimize the production of bacteriocins. The factors for DCCR were: sucrose, yeast extract, and Tween 80, fermentation time of 20 hours, temperature of 30 °C, and agitation of 100 rpm. In the DCCR tests, the response surfaces and the significant effects of the independent variables on the dependent variable (production of bacteriocins) were evaluated to establish a statistical model to optimize the process. The results indicated that the best bacteriocin production for *L. fermentum* and *L. mesenteroides* was 11,751.03 and 3693.34 AU/mL, respectively. Finally, the co-culture of the two strains was evaluated; however, the production of bacteriocins decreased, demonstrating that the *L. fermentum* and *L. mesenteroides* strains showed incompatibility.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides*; *Lactobacillus fermentum*; lactic acid bacteria, bacteriocin; agroindustry residues.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 A INDÚSTRIA DA FÉCULA DA MANDIOCA E A GERAÇÃO DE RESÍDUOS	4
3.2 BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO	6
3.3 BACTERIOCINAS	9
3.4 LEUCONOSTOC	12
3.4.1 Leuconostoc mesenteroides	14
3.5 LACTOBACILLUS	15
3.5.1 Lactobacillus fermentum	16
3.6 INIBIÇÃO DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO E BACTERIOCINAS	18
3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
4 REFERÊNCIAS	19
ARTIGO 1: <i>Lactobacillus fermentum</i> COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA	29
5.1 INTRODUÇÃO	29
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.2.1 Coleta de resíduos.....	31
5.2.2 Caracterização físico-química da água residuária de indústria de fécula de mandioca	31
5.2.3 Isolamento, caracterização e identificação das bactérias do ácido lático a partir dos resíduos do processamento da mandioca.....	32
5.2.4 Delineamento experimental para a produção de bacteriocinas	32
5.2.4.1 Plackett & Burman (PB)	32
5.2.4.2 Obtenção da cinética de produção bacteriocinas	35
5.2.4.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	35
5.2.4.4 Otimização e validação experimental do DCCR	36
5.2.5 Métodos analíticos	37
5.2.6 Determinação da produção de bacteriocinas	37
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.3.1 Isolamento e identificação das cepas de BAL obtidas de resíduos do processamento da mandioca.....	38
5.3.2 Produção de bacteriocinas.....	40

5.3.3 Otimização e validação experimental.....	41
5.3.3.1 Plackett - Burman (PB)	41
5.3.3.2 Cinética da produção de bacteriocinas	44
5.3.3.3 Condições ótimas para a produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i> pelo Delineamento Composto Central e Rotacional (DCCR)	46
5.3.3.4 Obtenção do ponto ótimo para o processo de produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	52
5.4 CONCLUSÕES.....	53
5.5 REFERÊNCIAS	54
ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA	62
6.1 INTRODUÇÃO.....	62
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	64
6.2.1 Inóculo de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	64
6.2.2 Meio de cultivo – água residuária de indústria de fécula de mandioca	64
6.2.3 Caracterização morfológica e bioquímica da cepa <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	65
6.2.4 Delineamento experimental para a produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	65
6.2.4.1 Preparo dos tratamentos para o Plackett & Burman (PB) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	65
6.2.4.2 Plackett & Burman (PB) para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	66
6.2.4.3 Obtenção da cinética de produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	67
6.2.4.4 Delineamento Composto Central e Rotacional (DCCR) para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	67
6.2.4.5 Otimização e validação experimental para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	69
6.2.5 Métodos analíticos para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	69
6.2.6 Determinação da atividade de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	69
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
6.3.1 Caracterização de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> isolada dos resíduos do processamento de mandioca	70
6.3.2 Produção de bacteriocinas	71
6.3.3 Otimização e validação experimental	72
6.3.3.1 Plackett & Burman (PB) para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	72
6.3.3.2 Cinética da produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	74
6.3.3.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	76
6.3.3.4 Obtenção do ponto ótimo para o processo de produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	83
6.4 CONCLUSÕES.....	84
6.5 REFERÊNCIAS	84

7 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR <i>Lactobacillus fermentum</i> E <i>Leuconostoc mesenteroides</i> EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA.....	92
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
ANEXO.....	98

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1: *Lactobacillus fermentum* COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

Tabela 1 Composição físico-química da água residuária da indústria de fécula de mandioca	31
Tabela 2 Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental fatorial Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas de <i>Lactobacillus fermentum</i>	34
Tabela 3 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental Plackett-Burman com três repetições no ponto central para a produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	34
Tabela 4 Variáveis independentes e níveis do planejamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	35
Tabela 5 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental composto central rotacional (DCCR) com três repetições no ponto central para a produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	35
Tabela 6 Produção de bacteriocinas de <i>Lactobacillus fermentum</i> no meio sintético e natural em 36 horas de fermentação	40
Tabela 7 Variáveis respostas do delineamento experimental Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	41
Tabela 8 Produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i> ao longo do tempo	44
Tabela 9 Variáveis respostas do Delineamento Composto Central e Rotacional (DCCR) para o cultivo de <i>Lactobacillus fermentum</i>	46
Tabela 10 Efeitos lineares, quadráticos e das interações do DCCR para a variável resposta produção bacteriocina por <i>Lactobacillus fermentum</i>	49
Tabela 11 Resumo da análise de variância para o ajuste do modelo para a produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	50

ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE *Leuconostoc mesenteroides* EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

Tabela 1 Parâmetros físico-químicos analisados para a caracterização da água residuária da fécula de mandioca.....	64
Tabela 2 Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental fatorial Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	66

Tabela 3 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	68
Tabela 4 Variáveis independentes e níveis do Delineamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	69
Tabela 5 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental composto central rotacional (DCCR) para a produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	69
Tabela 6 Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman com os valores reais e codificados e suas respostas para a produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	73
Tabela 7 Matriz do planejamento experimental DCCR com os valores reais e codificados das variáveis independentes e os valores obtidos para produção bacteriocina por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , eficiência de remoção de DQO, eficiência de remoção de açúcares totais, ácido lático, ácido acético, massa seca e pH, após 20 horas de fermentação	76
Tabela 8 Efeito do Tween 80 na produção de bacteriocinas por bactérias lácticas	78
Tabela 9 Efeitos lineares, quadráticos e das interações do DCCR para a variável resposta atividade de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80
Tabela 10 ANOVA para a produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a partir do DCCR	81

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*

Tabela 1 Comparação do modelo linear da produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> considerando diferentes critérios de seleção (AIC, R ² , R ² ajustado e BIC).....	93
Tabela 2 Produção de bacteriocinas (AU/mL) por cultura mista de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> e pelas cepas individuais	94
Tabela 3 Teste de incompatibilidade entre as bactérias do ácido lático <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	95

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação da mandioca	4
Figura 2 Representação esquemática as vias de fermentações do ácido láctico.....	7
Figura 3 Morfologia <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14
Figura 4 Representação do <i>Lactobacillus fermentum</i>	17

ARTIGO 1: *Lactobacillus fermentum* COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

Figura 1 Etapas dos processos envolvidos na produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	33
Figura 2 Bactéria do ácido láctico isolada da água residuária da fécula de mandioca com potencial para a produção de bacteriocinas.....	39
Figura 3 Gráficos de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	42
Figura 4 Cinética da produção de bacteriocina por <i>Lactobacillus fermentum</i> e produção do ácido láctico em função do tempo	45
Figura 5 Gráficos de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Delineamento Central Composto Rotacional para o cultivo de <i>Lactobacillus fermentum</i>	47
Figura 6 Superfície de resposta e gráficos de contorno correspondentes, mostrando os efeitos do extrato de levedura e sacarose na produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	51
Figura 7 Superfície de resposta e gráficos de contorno correspondentes, mostrando os efeitos da sacarose e Tween 80 na produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	51
Figura 8 Superfície de resposta e gráficos de contorno correspondentes, mostrando os efeitos do extrato de levedura e Tween 80 na produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	52
Figura 9 Valores ótimos dos substratos para a produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i> , determinado pelo método de desejabilidade.	53

ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE *Leuconostoc mesenteroides* EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

Figura 1 Etapas dos processos envolvidos na produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus fermentum</i>	65
---	----

Figura 2 Caracterização morfológica da <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	72
Figura 3 Gráfico de efeitos das variáveis independentes para a produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	74
Figura 4 Cinética da atividade de bacteriocina por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , produção do ácido láctico e massa seca em função do tempo.....	74
Figura 5 Gráficos de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Delineamento Central Composto Rotacional para cada variável resposta.	77
Figura 6 Superfícies de respostas da produção de bacteriocinas (AU/ml) em função dos fatores sacarose, extrato de levedura e Tween 80.....	82
Figura 7 Valores ótimos dos substratos para a produção de bacteriocinas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , determinado pelo método de desejabilidade.....	83

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*

Figura 1 Comparação da produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus Fermentum</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> para os ensaios do delineamento Plackett-Burman.	92
Figura 2 Comparação da produção de bacteriocinas por <i>Lactobacillus Fermentum</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Identificação dos principais gêneros de bactérias láticas.....	8
Quadro 2 Bacteriocinas produzidas por bactérias láticas	10
Quadro 3 Classificação das bacteriocinas em grupos	11
Quadro 4 Diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.....	12
Quadro 5 Espécies e subespécies do gênero <i>Leuconostoc</i>	13
Quadro 6 Bacteriocinas produzidas por <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	15
Quadro 7 Bacteriocinas isoladas pela bactéria láctica <i>Lactobacillus fermentum</i>	18

LISTA DE SÍMBOLOS

AL	Ácido láctico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
AnSBR	Reator anaeróbio de batelada sequencial
AU	Unidades arbitrárias
BAL	Bactérias do ácido láctico
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DQO	Demanda química de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized Safe
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MRS	Man Rogosa and Sharpe
pH	Potencial Hidrogeniônico
SST	Sólidos suspensos totais
ST	Sólidos totais
STV	Sólidos totais voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulico
TOC	Carbono orgânico total
TSA	Ágar triptona de soja

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma importante cultura alimentar para milhões de pessoas em diversas regiões do mundo, sendo que no Brasil é a quarta cultura mais produzida (CONAB, 2018). Durante o processamento da mandioca, para a produção de fécula e farinha, há geração de grandes quantidades de resíduos que muitas vezes não são manejados adequadamente.

O resíduo líquido, quando descartado sem o devido tratamento nos corpos hídricos, causa sérios problemas ambientais pela sua elevada carga orgânica e toxicidade. Porém, esse resíduo apresenta elevado valor nutricional, sendo rico em nutrientes, além de possuir biota autóctone com microrganismos de interesse biotecnológico, como as bactérias lácticas.

Bactérias do ácido láctico (BAL) são utilizadas em alimentos, como conservantes e na fermentação de produtos como carne, lácteos, vegetais e produtos de panificação. São microrganismos Gram-positivos, sem motilidade, não formadores de esporos, não patogênicos e geralmente são considerados seguros, de acordo com a Food and Drug Administration (FDA). Além disso, podem produzir bacteriocinas, que são peptídeos biologicamente ativos, que inativam ou inibem o crescimento de outras bactérias, por possuírem propriedades antimicrobianas.

A aplicação das bacteriocinas pode ser determinada pela biopreservação dos alimentos, por possuírem atividade antagônica ao crescimento bacteriano, com capacidade de controlar o crescimento de bactérias patogênicas no produto. Também possuem resistência a altas temperaturas, pH baixo e estabilidade enzimática proteolítica, o que favorece a aplicação na conservação de alimentos.

Devido à busca por novos conservantes naturais, em consequência das doenças causadas em relação aos produtos químicos, pesquisas têm sido realizadas visando à utilização de conservantes naturais. Dentre esses estudos o uso de bacteriocinas como bioconservante está ganhando destaque devido a sua ação contra bactérias patogênicas (SCHULZ, 2009; MACWAN et al., 2016).

Como os resíduos da indústria processadora de mandioca estão relacionados à presença de bactérias lácticas, torna-se relevante o estudo da produção de bacteriocinas para uma posterior aplicação em indústrias alimentícias, a fim de atenuar as perdas decorrentes da decomposição dos alimentos, elevar o valor agregado do produto e minimizar o impacto ambiental, aproveitando a água residuária da indústria de fécula de mandioca.

A produção de bacteriocinas pode ser influenciada por diversos fatores, como pH, temperatura, tempo de fermentação, agitação na fermentação, meio de cultivo, entre outros. O meio de cultivo pode ser suplementado com fontes de carbono e nutrientes para aumentar o crescimento dos microrganismos; sendo assim, é importante avaliar os substratos que exercem influência no meio, visando à otimização do meio para altas produções de bacteriocinas.

Dessa forma, o desenvolvimento deste trabalho consiste em avaliar a produção de bacteriocinas, explorando o aproveitamento da água residuária da fecularia de mandioca para minimizar o impacto ambiental, valorizar os resíduos da agroindústria e gerar produtos com valor agregado, bem como reduzir o custo do meio de cultura pelo aproveitamento de resíduos da agroindústria local.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de bacteriocinas por bactérias láticas utilizando a água residuária da indústria de fécula de mandioca como substrato.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias láticas a partir da água residuária da agroindústria processadora de mandioca, com potencial de produção de bacteriocinas;
- Avaliar a produção de bacteriocinas a partir das bactérias isoladas da água residuária da agroindústria processadora de mandioca e por uma cepa de *Leuconostoc mesenteroides* (isolada anteriormente);
- A partir do planejamento experimental, verificar os efeitos dos fatores sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e Tween 80 na composição do meio de cultivo;
- Otimizar a composição do meio contendo água residuária da agroindústria processadora de mandioca e substratos, a fim de aumentar a produção de bacteriocinas;
- Comparar a produção de bacteriocinas da cepa isolada e da cepa *Leuconostoc mesenteroides*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A indústria da fécula da mandioca e a geração de resíduos

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, pertence à família Euphorbiaceae e é um arbusto perene e lenhoso cultivado em regiões tropicais e subtropicais do mundo, podendo ser colhida a qualquer momento entre 8 e 24 meses (HSIEH et al., 2019; OKUDOH et al., 2014). Segundo Pandey et al. (2000), a mandioca é formada por uma zona aérea (composta por 2 ± 4 metros, com um tronco e ramos) e outra subterrânea, sendo esta formada por dois tipos de raízes: i) responsável pela nutrição da planta; e ii) referente à disposição axial em torno do tronco. São os denominados tubérculos que compõem a parte comestível da planta, sendo que cada planta pode ter 5 ± 20 tubérculos, e cada um pode atingir um comprimento de 20 ± 80 cm e um diâmetro de 5 ± 10 cm.

Atualmente, essa planta é a sexta cultura alimentar mais importante do mundo, sustentando milhões de pessoas na África subtropical e subtropical, na Ásia e na América Latina (TAPPIBAN et al., 2019). No Brasil, a mandioca é a quarta cultura mais produzida, com 21,08 milhões de toneladas de raiz de mandioca (CONAB, 2018). A área total plantada no Brasil em 2019 foi de 1.389.331 ha, tendo sido colhida uma área de 1.253.842 ha, com uma produção de 18.990.014 toneladas (IBGE, 2020).

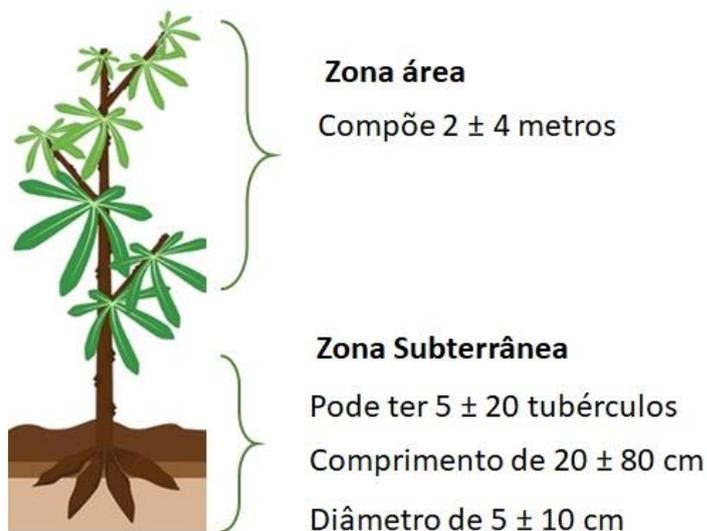


Figura 1 Representação da mandioca
Fonte: Pandey et al. (2000).

A mandioca possui uma boa adaptação em diferentes ambientes, podendo ser cultivada em áreas com baixa fertilidade e problemas do solo, como: alta fixação de fósforo, erosão, baixa base permutável e alto teor de alumínio, bem como tolera um grande intervalo sem chuvas (MORGAN; CHOCT, 2016).

Uma função importante da mandioca é que esta acumula amido no parênquima radicular, tornando-a uma fonte de carboidratos, possuindo ainda altos níveis de vitamina C, riboflavina, tiamina e niacina (PINTO-ZEVALLOS; PAREJA; AMBROGI, 2016). No entanto, essa planta possui um baixo teor de proteínas e baixa concentração dos aminoácidos essenciais (OLUGBEMI; MUTAYOBA; LEKULE, 2010).

A composição físico-química da mandioca crua, segundo o IBGE (2011), pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 Composição físico-química da mandioca crua em 100,00 gramas

Composição	Quantidade
Água (g)	59,68
Energia (kcal)	160,00
Proteína (g)	1,36
Gorduras totais (g)	0,28
Carboidrato (g)	38,06
Fibra alimentar total (g)	1,80
Monossacarídeos (g)	1,70
Cálcio (mg)	16,00
Magnésio (mg)	21,00
Fósforo (mg)	27,00
Ferro (mg)	0,27
Sódio (mg)	14,00
Potássio (mg)	271,00
Zinco (mg)	0,34
Tiamina (mg)	0,08
Vitamina C (mg)	20,06
Riboflavina (mg)	0,04

Fonte: Departamento de Informática em Saúde (2020)

Na industrialização da mandioca para a obtenção da fécula ocorre a separação de açúcares e fibras solúveis, gerando um amido purificado e grandes quantidades de resíduos, como a casca e o bagaço (SOUTO et al., 2016). Segundo Chavadej et al. (2019), para cada 100 kg de amido produzido 11,1 kg de resíduos de mandioca são gerados.

Os resíduos gerados no processamento da mandioca possuem uma grande quantidade de moléculas que podem ser convertidas em produtos de valor agregado, uma vez que são constituídos por: celulose obtida da casca (25%), hemicelulose (7%), proteína bruta (5%), amido residual (60%), fibras (20%) e lignina (3%) (MOSHI et al., 2015).

Na produção de farinha, os resíduos gerados são em maior parte resíduos sólidos, como a casca marrom, entrecascas, raízes inutilizáveis e farelo das raspas; já no processo

de extração da fécula, a geração de resíduos líquidos é maior (LEITE; ZANON; MENEGALLI, 2017; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Os resíduos da casca de mandioca (RCM) representam mais de 65% da produção anual global processada para o consumo humano (ASO; TEIXEIRA; ACHINEWHU, 2018). A mandioca processada gera 30% de sólidos (cascas e celulose), 20% de resíduos líquidos (água residuária da fécula da mandioca – bagaço) e 16% resíduos gasosos (umidade e cianeto) (OHIMAIN; SILAS-OLU; ZIPAMOH, 2013).

A água residuária da fécula de mandioca é considerada um resíduo com elevada carga de poluente, tendo um efeito tóxico aos seres humanos quando ingerida, devido ao glicosídeo cianogênico linamarina, podendo causar ainda problemas ao ambiente, se lançada em cursos d'água sem tratamento adequado (CAMPOS et al., 2006). Por outro lado, contém nutrientes como nitrogênio, fosforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, zinco, manganês, cobre, ferro e sódio (OLIVEIRA; REIS; NOZAKI, 2001).

Segundo Torres et al. (2017), a água residuária gerada na extração da fécula, lavagem e descascamento das raízes apresenta demanda química de oxigênio (DQO) entre 3 e 15 g/L, a concentração de açúcares totais de 2,5 a 4,6 g/L (ANDREANI et al., 2019), e o pH pode variar entre 4,5 a 6,5 (PALMA et al., 2018).

A concentração de açúcar na água e sua facilidade em ser biodegradada indica que esse resíduo possui um alto potencial para se tornar um cossubstrato em processos biotecnológicos (ANDREANI et al., 2019; NITSCHKE; PASTORE, 2006), bem como apresenta elevadas quantidades de nutrientes e microrganismos, como bactérias do ácido láctico, que possuem interesse biotecnológico (GOMES et al., 2016; VILVERT, 2019).

3.2 Bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico (BAL) são definidas como não-esporulantes, não-anaeróbicas (aerotolerantes), bactérias Gram-positivas que fermentam diversos açúcares, tendo o ácido láctico como principal produto final, não-patogênicas e geralmente são consideradas seguras – Generally Recognized as Safe (GRAS) de acordo com Food na Drug Administration (FDA) (SAUER et al., 2017; WANG et al., 2016).

Bactérias do ácido láctico possuem uma forte adaptação a nichos ricos em nutrientes, como leite, carne ou frutas; porém, essa vantagem reduziu as suas capacidades metabólicas, o que gerou uma dependência de fontes exógenas para aminoácidos, precursores de ácidos nucléicos e vitaminas, classificando as BAL como microrganismos fastidiosos (SAUER et al., 2017).

A obtenção de energia das bactérias lácticas ocorre exclusivamente por meio da fosforilação em nível de substrato (quando o grupo fosfato de um composto químico é removido e adicionado diretamente ao ADP), uma vez que esses microrganismos são desprovidos de porfirinas e citocromos, bem como não realizam a fosforilação oxidativa. O crescimento de todas as bactérias desse grupo é anaeróbio, porém a maioria não é sensível ao O_2 , tornando-as anaeróbias aerotolerantes (MADIGAN et al., 2010; PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1997).

A fermentação do ácido láctico depende da via utilizada para oxidação da glicose, podendo resultar na fermentação homofermentativa (produção de lactato) ou na fermentação heterofermentativa (lactato, etanol/acetato e CO_2), sendo essas fermentações apresentadas na Figura 2.

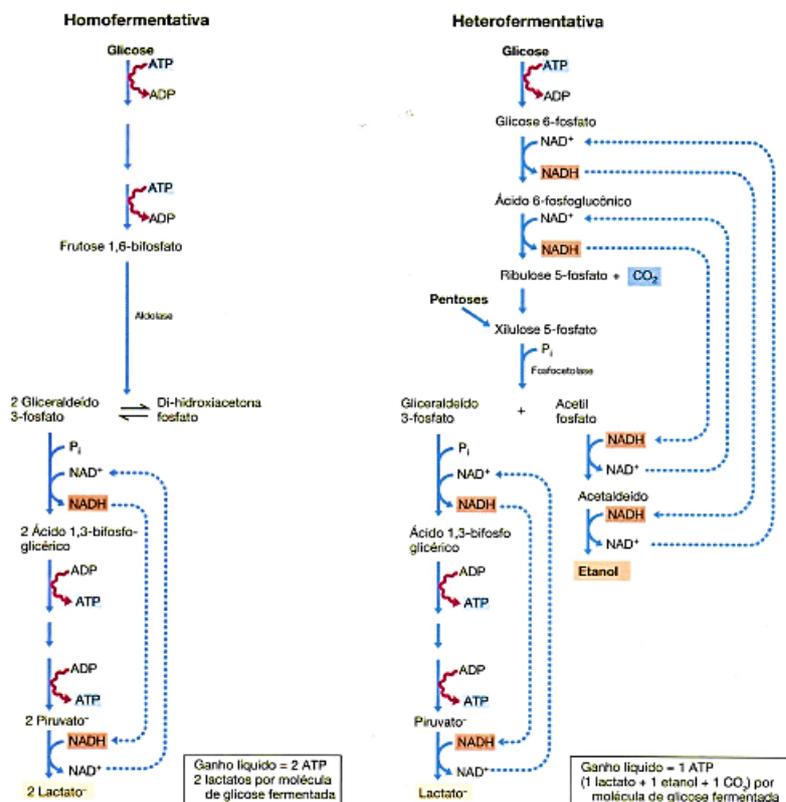


Figura 2 Representação esquemática as vias de fermentações do ácido láctico.

Legenda: (a) homofermentativas e (b) heterofermentativas.

Fonte: Madigan et al. (2010)

O tipo de fermentação pode ser determinado pela presença ou ausência da enzima aldolase, sendo esta enzima a chave da glicólise, presente em bactérias homofermentativas que produzem o lactato a partir da glicose. A energia disponível (hexose) é transformada, cerca de 85%, para ácido láctico pela bactéria do ácido láctico via piruvato para produzir energia e realizar o equilíbrio do redox (REIS et al., 2012).

Com a falta da aldolase nas heterofermentativas, essas bactérias não clivam a frutose bifosfato em triose fosfato. Dessa forma, elas oxidam a glicose 6-fosfato a 6-fosfogluconato e, em seguida, realizam sua descarboxilação, formando a pentose fosfato. A pentose fosfato é convertida a triose fosfato e acetil fosfato pela enzima fosfocetolase. A triose fosfato é finalmente convertida em ácido láctico, com a produção de ATP. Porém, para a obtenção do equilíbrio redox, o acetil fosfato produzido é reduzido por NADH e convertido a etanol. Esse processo ocorre sem a síntese de ATP, uma vez que a ligação CoA rica em energia é perdida durante o redox. Ainda, uma vez que ocorre a descarboxilação do 6-fosfogluconato, as heterofermentativas produzem CO₂ (MADIGAN et al., 2010).

Considerando os dois tipos de fermentações do ácido láctico, verifica-se que a grande diferença está relacionada com os tipos de produtos formados. Dessa forma, Madigan et al. (2010) agruparam os principais gêneros das bactérias lácticas e identificou entre homofermentativos e heterofermentativos (Quadro 1).

Quadro 1 Identificação dos principais gêneros de bactérias lácticas

Formato e arranjo celular	Gênero
Cocos em cadeias ou tétrades	
• Homofermentativo	<i>Streptococcus</i>
	<i>Enterococcus</i>
	<i>Lactococcus</i>
	<i>Pediococcus</i>
• Heterofermentativo	<i>Leuconostoc</i>
Bacilos, normalmente em cadeias	
• Homofermentativo/ Heterofermentativo	<i>Lactobacillus</i>

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: *Alloiococcus*, *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).

O ácido láctico produzido por bactérias lácticas possui diversas aplicações em indústrias como a farmacêutica, química ou de alimentos, sendo que a produção estimada desse ácido é de 100 mil toneladas ao ano. É um produto que pode ser utilizado como acidulante, conservantes de bebidas e alimentos, na produção de plásticos biodegradáveis, produtos químicos oxigenados, reguladores do crescimento de plantas, bem como pode ser

introduzido em curtumes, indústria têxtil e lavanderia (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2010). A Fermentação do ácido láctico é o principal fator pela acidificação dos produtos lácteos, sendo utilizada na produção de iogurte e outros produtos fermentados advindos do leite (queijo, leite, creme de leite).

Liu, Han e Zhou (2011) relataram os benefícios que as BAL possuem durante a fermentação, sendo eles: preservação dos alimentos através do ácido láctico, ácido acético, etanol e fermentações alcalinas; melhora das propriedades organolépticas; enriquecimento dos alimentos com substratos como proteínas, aminoácidos essenciais, ácidos graxos e vitaminas; e aumento dos benefícios à saúde, uma vez que algumas estirpes podem colonizar o intestino humano e de animais, ajudando na digestão.

Além do que foi exposto, algumas espécies das BAL produzem as bacteriocinas e essas possuem um elevado potencial como biopreservadores e anti-infecciosos, com uma alta diversidade estrutural e funções (KUMARIYA et al., 2019; O'CONNOR et al., 2015). As bacteriocinas são microrganismos utilizados para preservar os alimentos, como as espécies *Lactococcus*; *Lactobacillus* e *Streptococcus*, que agem no queijo, vegetais em conserva e iogurte, respectivamente (WANG et al., 2016).

A classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico é baseada em diversos critérios, como o peso molecular, modificação pós-traducional e atividade biológica, sendo que para a produção são necessários meios complexos para o crescimento, podendo ser usados os MRS, M17, M17S, CM e SM8 (GHARSALLAOUI et al., 2016; PAPAGIANNI et al., 2006).

3.3 Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizadas ribossomicamente e produzidas durante a fase primária de crescimento (ocorre durante o meio da fase de crescimento exponencial, atingindo o nível máximo na fase exponencial ou no início da primeira fase estacionária); são inibitórias contra outras bactérias, sendo utilizadas tradicionalmente como conservantes de alimentos (adicionadas ou produzidas por culturas iniciais durante a fermentação) (CHIKINDAS et al., 2018; JUTURU; WU, 2018).

O peso molecular das bacteriocinas é geralmente baixo, são pós-traduzidas modificadas e degradadas rapidamente por enzimas proteolíticas (geralmente por proteases do trato gastrointestinal humano), sendo também anfipáticas (ZACHAROF; LOVITT, 2012). Bactérias do ácido láctico que produzem as bacteriocinas representam um

grupo heterogêneo de peptídeos codificados por um vasto repertório genético (FIELD; ROSS; HILL, 2018).

A identificação das bacteriocinas pode ser realizada conforme as suas funções bioquímicas e características genéticas, bem como pela presença das ligações de dissulfeto ou monossulfureto, peso molecular, estabilidade ao calor, estabilidade enzimática proteolítica, presença ou ausência de modificação pós-tradução de aminoácidos e pela ação antimicrobiana (ABEE; KLAENHAMMER; LETELLIER, 1994; AHMAD et al., 2017).

Segundo Moreno et al. (2008), as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas estão representadas no Quadro 2.

Quadro 2 Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas

Espécie produtora	Bacteriocina	Espectro de Atividade
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	Nisina Lacticina 481 Bacteriocina V e VII	Bactérias Gram-positivas <i>Clostridium</i> <i>Clostridium</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacina F	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. curvatus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Curvacina A	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. carnis</i>	Bacteriocina S	<i>Enterococcus</i> <i>Listeria</i>
<i>L. sakei</i>	Sakacina A Sakacina P	<i>Enterococcus sp.</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Leucocina A-UAL 187	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesenterocina 5 Mesenterocina Y105	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Listeria monocytogenes</i>

Fonte: Moreno, Lerayer e Leitão (2008)

A nisina é considerada uma das bacteriocinas mais importantes, sendo definida e documentada pela FDA como um GRAS, ou seja, é identificada como um agente seguro nos sistemas alimentares, devido a sua ação antimicrobiana e a sua decomposição através da digestão enzimática (ZACHAROF; LOVITT, 2012). Produzida pelo *Lactococcus lactis ssp. Lactis* a nisina é composta por 34 aminoácidos, possui um peso molecular de 3500 DA, sendo um polipeptídeo catiônico, hidrofóbico e estável ao calor (JUTURU; WU, 2018). De acordo Gharsallaoui et al.(2016), é amplamente utilizada na produção industrial, uma vez que possui aplicações específicas, como a preservação dos esporos de germinação, e impede o crescimento das bactérias patogênicas que contaminam a superfície dos produtos alimentares.

Há um vasto grupo heterogêneo que compõe as bacteriocinas, sendo diferenciadas pela estrutura primária, pela composição e pelas propriedades físico-químicas, podendo ser caracterizadas através de estudos do espectro de atividade, modo de ação, efeitos da temperatura na fermentação, pH, enzimas proteolíticas, sal, detergentes; bem como podem ser determinadas pela sequência dos aminoácidos, organização genética (GARCÍA et al., 2010; TODOROV, 2009).

Segundo Zou (2018), estão distribuídas em quatro classes diferentes. A classe I, lantibióticos, representados pela nisina, são peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular e possuem lantionina e derivados; a classe II são pequenos peptídeos termoestáveis; a classe III são peptídeos termolábeis de alto peso molecular; e a classe IV é representada por grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura. Heng e Tagg (2006) elaboraram esquemas que classificaram essas classes de uma forma sucinta (Quadro 3).

Quadro 3 Classificação das bacteriocinas em grupos

	Classes	Características gerais	Produtos pela BAL
I	Lantibióticos	Modificado, estável ao calor, < 15 kDa	
	a) Linear	Forma pura, catiônica	Nisina, Lacticina 481, Plantaricina C
	b) Globular	Inibitória enzimática, não catiônica	Nenhuma
	c) Multicomponentes	Dois peptídeos	Lct3147, Plantaricina W
II	Peptídeos não modificados	Estável ao calor, <15 kDa	
	a) Pediocina	anti-listeria, consenso YGNGV	Pediocina PA1/ch, enterocina A, Sakacina A
	b) Diversas	Não pediocina	Enterocina B,L50, Carnobacteriocina A
	c) Multicomponentes	Dois peptídeos	Lactococcina G, Plantaricina S,Lacticina F
III	Proteínas grandes	Termolábil, <30 kDa	
	a) Bacteriolítico	Degradação da parede celular	Enterolisina A, Lcn972 ^a
	b) Não-lítico	Alvos citosólicos	Colicinas ^b E2-E9
IV	Peptídeos circular	Estável ao calor, ligação peptídica da cabeça da cauda	AS-48, Gassericina A, Acidocina B

Legenda: ^a Lcn972 liga-se ao lipídeo precursor da parede celular II e bloqueia a biossíntese da parede celular, 15 kDa; ^b Colicinas são sintetizadas pela *E.coli*.

A produção das bacteriocinas nas respectivas classes (I, II, III e IV) possui características similares, como: imunidade à sua própria bacteriocina; resistência ou sensibilidade a outras bacteriocinas; e produção de mais de um composto antimicrobiano. A

mesma bacteriocina pode ser produzida por diferentes gêneros e a mesma subespécie pode produzir outros tipos de compostos (COTTER; HILL; ROSS, 2005; PAULA et al., 2015)

Os Lantibióticos (Classe I) e Peptídeos não modificados (Classe II) detêm a maior parte das bacteriocinas descobertas, uma vez que são as mais compreendidas e prováveis de serem utilizadas em alimentos, pela sua especificidade e robustez (CLEVELAND et al., 2001).

Considerando as características das bacteriocinas, é importante ressaltar que apesar de algumas funções serem similares aos antibióticos, há diferenças fundamentais, sendo representadas no Quadro 4 (CLEVELAND et al., 2001; REBELLO; GASPAR, 2010)

Quadro 4 Diferenças entre bacteriocinas e antibióticos

Características	Bacteriocinas	Antibióticos
Aplicação	Alimentos	Clinica
Modo de produção	Síntese ribossomal	Sintetizados por enzimas
Atividade	Espectro estreito	Variação de espectro
Imunidade da célula hospedeira	Possui	Não possui
Ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo humano	São digeridas	Não são digeridas
Mecanismo da célula-alvo para resistência ou tolerância	Geralmente por adaptação das células afetadas	Geralmente por transmissão de determinantes genéticos
Fase de produção	Metabolismo primário	Metabolismo secundário
Modo de ação	Geralmente formação de esporos	Membrana celular ou alvos intracelulares
Toxicidade	Nenhum conhecido	Possui

Fonte: Adaptado de Cleveland et al. (2001) e Rebello; Gaspar(2010).

Segundo Cavera e colaboradores (2015), o uso excessivo de antibiótico causa a morte da microbiota saudável e a contaminação ambiental, causando danos imediatos e prolongados; portanto, os autores sugerem o uso das bacteriocinas para inibição de patógenos tanto na indústria alimentícia como na indústria médica.

3.4 *Leuconostoc*

Leuconostoc é um gênero de bactérias lácticas heterofermentativas frequentemente utilizadas na produção de alimentos fermentativos, estão presentes em laticínios, são utilizadas como culturas iniciadoras ou adjuntas em diferentes produtos variantes do leite, como o queijo e a manteiga, e esses microrganismos geralmente são considerados seguros (D'ANGELO et al., 2017; LIU; HOLLAND, 2004).

As características gerais do gênero *Leuconostoc* são definidas como: mesofílicos (ótimo crescimento entre 20-30 °C), Gram-positivos, catalase negativa, obrigatoriamente heterofermentativos (produtos são lactato, etanol e CO₂), frequentemente elipsoidais, não têm motilidade, não formam esporos, são anaeróbios facultativos, não hemolíticos, resistentes à vancomicina, não são patogênicos e requerem meio complexo de crescimento (geralmente crescem em meio caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (HOLT et al., 1994; LIU, 2016; THUNELL, 1995).

A utilização desse tipo de bactéria láctica possui uma grande importância econômica e diversos aspectos positivos, como a fermentação de alimentos (chucrute, pickles, carnes, laticínios), produção de gás (CO₂) em queijos que possuem “aberturas”, produção de compostos para o aroma nos produtos de laticínio, produção in situ de dextrano em produtos que contêm sacarose e funciona como um potencializador em alimentos funcionais (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004).

O crescimento do gênero *Leuconostoc* ocorre em estreita simbiose com a população de *Lactococcus*, sendo que sua presença é benéfica na produção de compostos aromáticos (diacetil e acetoína a partir de citrato) (MCAULIFFE, 2017). Além dessas características, esse microrganismo possui ação bacteriocinogênica (BORGES, 2017).

No estudo realizado por Liu (2016), o autor identificou na literatura 13 espécies para o gênero *Leuconostoc* e 3 subespécies da *Leuconostoc mesenteroides*, elencadas no Quadro 5.

Quadro 5 Espécies e subespécies do gênero *Leuconostoc*

Espécies	Fonte primária
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
-subsp. <i>mesenteroides</i>	Plantas, queijos de leite cru, carnes
-subsp. <i>dextranicum</i>	Plantas, queijos de leite cru
-subsp. <i>cremoris</i>	Laticínios
<i>Leuconostoc lactis</i>	Laticínios
<i>Leuconostoc carnosum</i>	Carnes refrigeradas
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	Carnes refrigeradas
<i>Leuconostoc fallax</i>	Chucrute (repolho em conserva)
<i>Leuconostoc inhae</i>	Kimchi (comida Coreana)
<i>Leuconostoc kimchii</i>	Kimchi
<i>Leuconostoc citreum</i>	Kimchi
<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	Café
<i>Leuconostoc palmae</i>	Vinho palma
<i>Leuconostoc miyukkimchii</i>	Algas marrons
<i>Leuconostoc garlicum</i>	Alho

Fonte: Liu (2016).

A bactéria *Leuconostoc* possui potencial para a produção de bacteriocinas, uma vez que possui atividade inibitória contra microrganismos patogênicos e deteriorantes (XIRAPHI et al., 2007). A primeira bacteriocina isolada desse gênero foi obtida por *Leuconostoc gelidium* UAL 187, advinda da carne, sendo denominada de leucocina A (HASTINGS et al., 1991).

3.4.1 *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides é considerada uma importante representante das bactérias heterofermentativas e possui como produto principal o ácido láctico, devido à presença da enzima D-lactato desidrogenase (LdhD) durante o metabolismo do piruvato na fermentação; porém, também produz ácido acético, etanol e CO₂ (SILVA, 2013).

As características dessa bactéria podem ser descritas como: Gram-positivas, catalase negativa, possuem baixo conteúdo (31-49%) de guanina + citosina (G + C) na sequência do DNA ribossomal, sua morfologia é na forma de cocóides ou cocobacilos (Figura 3), são fastidiosas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, mesófilas, podem sobreviver em até 7% (m/v) de NaCl, e com crescimento ótimo na faixa de 20 a 30 °C (PAULA et al., 2015).

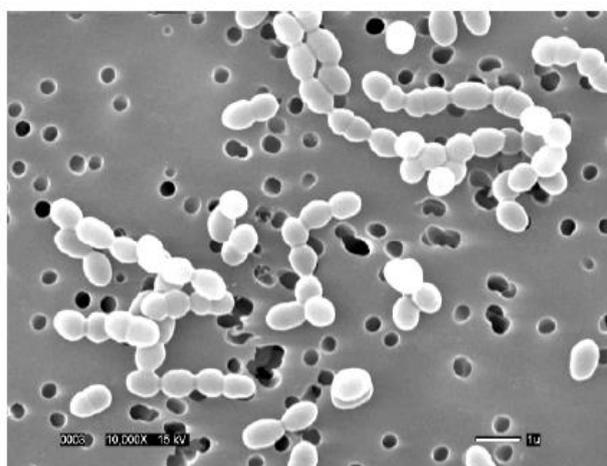


Figura 3 Morfologia *Leuconostoc mesenteroides*
Fonte: (CORTEZI, 2004).

A *Leuconostoc mesenteroides* pode ser encontrada em diferentes ambientes como, por exemplo, em vegetais (MASUDA et al., 2011), cereais (KIVANÇ; FUNDA, 2017), frutas (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2010; TODOROV; DICKS, 2008), vinho (MONTERSINO et al., 2008), peixe (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2011; ALLAMEH et al., 2012), carne (AYMERICH et al., 2006) e produtos lácteos (HERREROS et al., 2005; RANI; AGRAWAL, 2008).

Na literatura, a primeira cepa de *Leuconostoc mesenteroides* que foi relatada por produzir bacteriocinas foi a *Leuconostoc mesenteroides* UL5, denominada de mesenterocina 5, isolada do queijo cheddar durante um período de incubação de 18 horas, sendo que esse microrganismo possui uma atividade antibacteriana (DABA et al., 1991).

Bacteriocinas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* podem ser visualizadas resumidamente no Quadro 6.

Quadro 6 Bacteriocinas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides*

Bacteriocinas isoladas da <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Fonte primária	Referência
Mesenterocina E 131	Salsicha fermentada tradicional grega	(XIRAPHI et al., 2008)
Mesenterocina 5	Queijo cheddar	(DABA et al., 1991)
Mesenterocina 52	Leite de vaca cru	(MATHIEU et al., 1993)
Mesenterocina 52 A e B	Leite de vaca cru	(REVOL-JUNELLES et al., 1996)
Mesenterocina Y105	Tratamento com novobiocina	(HÉCHARD; BERJEAUD; CENATIEMPO, 1999)
Leucocina A, B e C	Carnes processadas	(PAPATHANASOPOULOS et al., 1997)
Leucocyclin Q	Picles japonês	(MASUDA et al., 2011)
Mesenteroides IMAU: 10231	Salsicha Sremska	(MORAČANIN et al., 2013)
Mesenterocina W-SJRP55 e Z-SJRP55	Mussarela de búfala	(PAULA et al., 2015)
Mesenterocina FB111	Kimchi	(LE; YANG, 2018)

Segundo Ramos e colaboradores (2015), analisando uma bebida fermentada a partir da mandioca (resíduo desse estudo), denominada tarubá, identificaram a presença de bactérias lácticas (BAL) com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, sendo esta isolada por uma técnica de análise de DNA – DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante).

3.5 *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* foi descrito inicialmente em meados do século XX, possui espécies encontradas em habitats ricos em nutrientes, como nos alimentos, rações, plantas, animais e seres humanos; porém, a maioria das espécies são encontradas em superfícies de folhas e solo, na forma de vida livre (DUAR et al., 2017).

As espécies *Lactobacillus* são muito interessantes do ponto de vista prático e científico: possuem diversos usos na indústria alimentícia, como probiótico e em aplicações biotecnológicas e terapêuticas (STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017), são responsáveis pelo desenvolvimento de aroma e sabor em certos alimentos, como do queijo, devido às suas atividades proteolíticas e lipolíticas (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000).

Segundo Zheng et al. (2015), *Lactobacillus* spp. são utilizados na produção de alimentos desde do início da agricultura, uma vez que contribuem na fermentação destes. O seu uso na indústria alimentícia é considerado seguro, bem como suas diversas aplicações tornam esse grupo de bactérias muito importante economicamente.

A classificação desse gênero é realizada a partir de critérios morfológicos e fisiológicos, sendo considerado Gram-positivo, com morfologia bacilar, a energia produzida é exclusivamente através de fermentação, não formadores de esporos e são aerotolerantes (SLOVER, 2008). O tamanho dos genomas entre as espécies pode variar, sendo que o maior encontrado foi o da espécie *Lactobacillus parakefiri*, com 4,91 Mb (TANIZAWA et al., 2017), e o menor, 1,3 Mb, *Lactobacillus iner* (MACKLAIM et al., 2011).

Segundo Fox et al. (2000), o gênero *Lactobacillus* são categorizados em três grupos que diferem-se a partir do produto final da fermentação, sendo:

- *Lactobacillus* termofílicos homofermentativos obrigatórios: fermentam apenas hexoses a ácido láctico; são os *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii lactis* e *Lactobacillus helveticus*;
- *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos facultativos: podem fermentar outras fontes de carbono além das hexoses, produzindo ácidos orgânicos, CO₂, álcool e H₂O₂; são os *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*;
- *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos obrigatórios: utilizam obrigatoriamente hexoses e pentoses como fonte de carbono, fermentando hexose a ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂ e pentoses a ácido láctico e ácido acético; são *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*.

Os homofermentativos e heterofermentativos, facultativos e obrigatórios, produzem o ácido láctico a partir da mesma via metabólica, uma vez que usam o piruvato produzido como acceptor orgânico de elétrons. A redução do piruvato é catalisada por enzimas denominadas de Lactato-desidrogenases, que reduzem um mol de piruvato a ácido láctico e, durante o processo, oxidam um mol de NADH a NAD⁺ (GÄNZLE, 2015).

3.5.1 *Lactobacillus fermentum*

Lactobacillus fermentum é uma bactéria amplamente conhecida. O seu uso aparentemente não produz efeitos negativos, sendo utilizada em diversos alimentos para consumo humano (ZHANG et al., 2010). Em 2009 foi incluída no “Qualified Presumption of Safety” (QPS) – status que indica que um grupo de microrganismos não apresenta preocupações em relação a segurança alimentar, pela autoridade europeia de segurança

alimentar – European Food Safety Authority (EFSA) (LEUSCHNER et al., 2010). Em 2011 foi adicionada à lista de bactérias que podem ser utilizadas em alimentos na China, já em 2013 foi classificada como organismos geralmente reconhecidos como seguro (“Generally Recognized as Safe” – GRAS) pela US Food and Drug Administration (FDA) (ZHAO et al., 2019).

Pertencente ao grupo *Lactobacillus reuteri*, a espécie *L. fermentum* é frequentemente isolada de plantas e cereais fermentados, raramente é encontrada nos ecossistemas intestinais (GÄNZLE; RIPARI, 2016), já foi identificada em produtos lácteos, esgoto, boca e fezes de seres humanos, fermentação de vegetais, (ZHAO et al., 2019) e em fermentações de mandioca (ADEDOKUN et al., 2016; AYODEJI et al., 2017; KOSTINEK et al., 2008).

Essa bactéria tem sido classificada como um probiótico, uma bactéria Gram-positiva com atividade oxidante e antimicrobiana (LIEPA; VIDUŽA, 2018), são mesofílicas heterofermentativas obrigatórias (FOX et al., 2000), organismos nômades e de vida livre (DUAR et al., 2017), com um bom crescimento a 45 °C e não apresenta crescimento em temperaturas inferiores a 15 °C, podendo formar colônias branco-acinzentadas com cerca de 1 mm em diâmetro. *L. fermentum* são representadas na Figura 5 (ZHOU; LI, 2015).

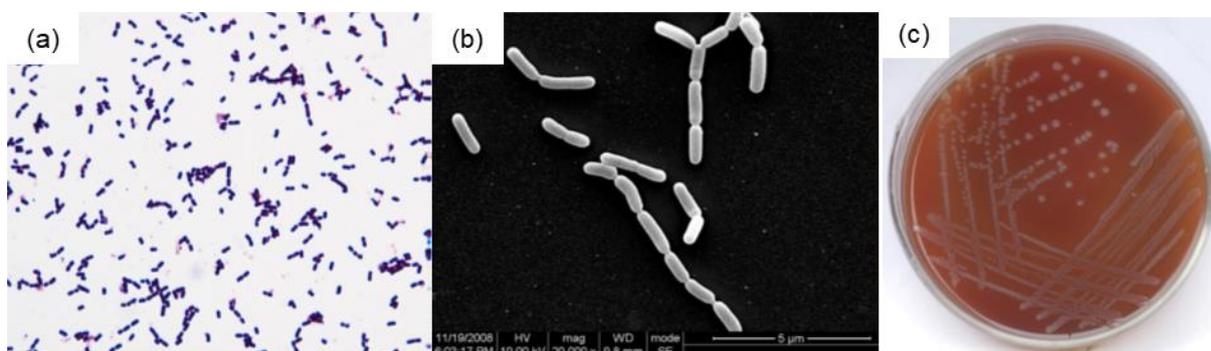


Figura 4 Representação do *Lactobacillus fermentum*

Legenda: a) Célula *L. fermentum* Gram-positiva; b) Célula *L. fermentum* com 0,5-0,9 μm de diâmetro; c) Colônias de *L. fermentum* (sangue BHI ágar).

Fonte: Zhou e Li (2015).

O formato das colônias de *L. fermentum* pode ser convexo ou ligeiramente convexo, com superfície lisa, as colônias não são transparentes em ágar-sangue BHI (Figura 4c), possuem uma estrutura de círculo concêntrico no centro da colônia quando observado no estereomicroscópio (ZHOU; LI, 2015).

Cepas de *L. fermentum* com ação bacteriocinogênica são escassas até o momento. As cepas que foram identificadas como isolados de *L. fermentum* com produção de bacteriocinas são descritas no Quadro 7.

Quadro 7 Bacteriocinas isoladas pela bactéria láctica *Lactobacillus fermentum*

Bacteriocinas isoladas de <i>Lactobacillus fermentum</i>	Fonte primária	Peso molecular	Referência
Bacteriocina L-23	Cotonotes vaginais de mulheres saudáveis	~7000 Da	(PASCUAL et al., 2008)
Bacteriocina CS57	Secreções vaginais humanas	>30 kDa	(SABIA et al., 2014)
Bacteriocina NM 322	Azeitonas verde	~8000 Da	(MOJGANI et al., 2012)
BLIS LF5174	Cepa da bactéria <i>L. fermentum</i> obtida por coleção	~54 kDa	(SHAH; DAVE, 1999)
Fermencina SD11*	Via oral humana	33,593 kDa	(WANNUN; PIWAT; TEANPAISAN, 2016)
Fermenticina B	Cepa da bactéria <i>L. fermentum</i> obtida por coleção	3 a 5 kDa	(YAN; LEE, 1997)
Fermencina SA715*	Leite de cabra	1792,537	(WAYAH; PHILIP, 2018)

*Fermencina SD11 e SA715: Somente essas bacteriocinas possuem o peso molecular exato.

Na literatura verifica-se que o potencial para a produção de bacteriocina a partir de *L. fermentum* ainda não é muito explorado. Das bacteriocinas identificadas, apenas a SA715 (WAYAH; PHILIP, 2018) e a Fermencina SD11 (WANNUN; PIWAT; TEANPAISAN, 2016) foram purificadas até a homogeneidade. Dessa forma, torna-se relevante e importante o estudo de *L. fermentum* com potencial para produção de bacteriocinas.

3.6 Inibição das bactérias do ácido láctico e bacteriocinas

Segundo Reis e colaboradores (2012), a inibição do crescimento celular pode ocorrer pela presença do ácido láctico uma vez que a solubilidade do próprio ácido pode não se dissociar na membrana do citoplasma e com a insolubilidade do lactato dissociado, causar a acidificação do citoplasma e falha na força motriz do próton (energia de transferência de elétrons), o que diminui a quantidade de energia para as células crescerem.

A produção da bacteriocina pode ser afetada por diversos fatores, como, por exemplo, a falta de carbono e de nitrogênio no meio, que são condições para a fermentação (pH, temperatura, agitação) (CHEIGH et al., 2002).

Segundo Schillinger; Geisen e Holzapfel (1996), os fatores que influenciam na eficácia da produção de bacteriocinas são:

- O aparecimento de patógenos resistentes ou bactérias deteriorantes;
- Algumas condições que desestabilizam a atividade biológica de proteínas, como as proteases ou processos de oxidação;

- Ligação a componentes alimentares, como partículas de gorduras ou superfície de proteínas;
- Inativação por outros aditivos;
- Má solubilidade e distribuição inadequada na matriz alimentar;
- Efeitos do pH na estabilidade e na atividade da bacteriocina.

Com o intuito de aumentar a vida útil dos alimentos, são utilizados métodos com baixas e altas temperaturas, agentes quelantes, antimicrobianos, sistema lactoperoxidase e combinação de bacteriocinas (CHEN; HOOVER, 2003).

O pH é um fator importante para identificar a liberação da bacteriocina no meio extracelular: os valores de pH inferiores a 5 estão correlacionados com o consumo de lactose pelas células, que é convertido em ácido láctico (JOZALA, 2009). Quando os valores de pH são menores que 6, mais de 80% da nisina produzida é liberada ao meio de crescimento, porém valores maiores que esse valor contribuem para que a nisina fique associada à membrana celular e no interior de célula (HURST; KRUSE, 1972). A solubilidade e a estabilidade da nisina podem aumentar significativamente com o aumento da acidez do meio, a nisina é considerada estável em pH 2 e pode ser esterilizada a 121 °C (BISWAS et al., 1991).

3.7 Considerações finais

O aumento da demanda no mercado mundial por alimentos naturais e saudáveis influenciou diretamente o aumento de novas tecnologias para a biopreservação dos alimentos. Peptídeos antimicrobianos de bactérias do ácido láctico, como as bacteriocinas, podem ser utilizados como bioconservantes. Nesse contexto, é importante verificar a produção de bacteriocinas para atender o mercado alimentício. A produção de bacteriocina pode ser realizada selecionando fatores pelo delineamento experimental Plackett-Burman (PB) e otimizada por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) utilizando como substrato a água residuária da fécula de mandioca.

4 REFERÊNCIAS

ABEE, T.; KLAENHAMMER, T. R.; LETELLIER, L. Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 3, p. 1006-13, 1994.

ADEDOKUN, E. O.; RATHER, I. A.; BAJPAI, V. K.; PARK, Y.-H. Biocontrol efficacy of

Lactobacillus fermentum YML014 against food spoilage moulds using the tomato puree model. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 1, p. 64-68, 2016.

AHMAD, V.; KHAN, M. S.; JAMAL, Q. M. S.; ALZOHAIRY, M. A.; KARAAWI, M. A. A.; SIDDIQUI, M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 1, p. 1-11, 2017.

ALLAMEH, S. K.; DAUD, H. H. M.; YUSOFF, F. M.; SAAD, C. R.; IDERIS, A. Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 16, p. 3810-3816, 2012.

ANDREANI, C. L.; TONELLO, T. U.; MARI, A. G.; LEITE, L. C.; CAMPAÑA, H.; LOPES, D. D.; RODRIGUES, J. A.; 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, n. 3, p. 1474-1482, 2019.

ASO, S. N.; TEIXEIRA, A. A.; ACHINEWHU, S. C. Cassava Residues Could Provide Sustainable Bioenergy for Cassava Producing Nations. **Cassava**. [s.l.] InTech, 2018.

AYMERICH, T.; MARTÍN, B.; GARRIGA, M.; VIDAL-CAROU, M. C.; BOVER-CID, S.; HUGAS, M. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 1, p. 40-49, 2006.

AYODEJI, B. D.; PICCIRILLO, C.; FERRARO, V.; MOREIRA, P. R.; OBADINA, A. O.; SANNI, L. O.; PINTADO, M. M. E. Screening and molecular identification of lactic acid bacteria from gari and fufu and gari effluents. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 123-133, 2017.

BISWAS, S. R.; RAY, P.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1265-1267, 1991.

BORGES, D. O. **Efeito de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em creme fermentado**. 2017. 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Estadual Paulista - UNESP, São José do Rio Preto, 2017.

CAMPOS, A. T.; DAGA, J.; RODRIGUES, E. E.; FRANZENER, G.; SUGUIY, M. M. T.; SYPERRECK, V. L. G. Tratamento de águas residuárias de fecularia por meio de lagoas de estabilização. **Engenharia Agrícola**, v. 26, n. 1, p. 235-242, 2006.

CAVERA, V. L.; ARTHUR, T. D.; KASHTANOV, D.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 5, p. 494-501, 2015.

CHAVADEJ, S.; WANGMOR, T.; MAITRIWONG, K.; CHAICHIRAWIWAT, P.; RANGSUNVIGIT, P.; INTANOO, P. Separate production of hydrogen and methane from cassava wastewater with added cassava residue under a thermophilic temperature in relation to digestibility. **Journal of Biotechnology**, v. 291, p. 61-71, 2019.

CHEIGH, C.-I.; CHOI, H.-J.; PARK, H.; KIM, S.-B.; KOOK, M.-C.; HWANG, J.-K.; PYUN, Y.-R. 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, n. 3, p. 225-

235, 2002.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 3, p. 82-100, 2003.

CHIKINDAS, M. L.; WEEKS, R.; DRIDER, D.; CHISTYAKOV, V. A.; 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. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

CORTEZI, M. **Estudo da produção de dextranasacarase por Leuconostoc mesenteroides FT 045 B**. 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rio Claro, 2004.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

D'ANGELO, L.; CICOTELLO, J.; ZAGO, M.; GUGLIELMOTTI, D.; QUIBERONI, A.; SÁREZ, V. Leuconostoc strains isolated from dairy products: Response against food stress conditions. **Food Microbiology**, v. 66, p. 28-39, 2017.

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, n. 12, p. 3450-5, 1991.

DUAR, R. M.; LIN, X. B.; ZHENG, J.; MARTINO, M. E.; GRENIER, T.; PÉREZ-MUÑOZ, M. E.; LEULIER, F.; GÄNZLE, M.; WALTER, J. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus Lactobacillus. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, p. S27-S48, 2017.

FIELD, D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 1-6, 2018.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T.M.; GUINEE, T. P. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg, MD: Aspen Pub, 2000.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106-117, 2015.

GÄNZLE, M.; RIPARI, V. Composition and function of sourdough microbiota: from ecological theory to bread quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 19-25, 2016.

GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ-RUBIO, L.; RODRIGUES, A.; MARTÍNEZ, B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 8, p. 373-382, 2010.

GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N.; JOLY, C.; DEGRAEVE, P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 8, p. 1262-1274, 2016.

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MAÑUNGA, 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, n. 19, p. 8120-8131, 2016.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 738-747, 2010.

HASTINGS, J. W.; SAILER, M.; JOHNSON, K.; ROY, K. L.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 23, p. 7491-500, 1991.

HÉCHARD, Y.; BERJEAUD, J.-M.; CENATIEMPO, Y. Characterization of the mesB Gene and Expression of Bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. **Current Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 265-269, 30 nov. 1999.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 467-494, 2004.

HENG, N. C. K.; TAGG, J. R. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 160-160, 2006.

HERREROS, M. A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLEZ, L.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 455-459, 2005.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wikins, 1994.

HSIEH, C.-F.; LIU, W.; WHALEY, J. K.; SHI, Y. Structure, properties, and potential applications of waxy tapioca starches – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 225-234, 2019.

HURST, A.; KRUSE, H. Effect of secondary metabolites on the organisms producing them: effect of nisin on *Streptococcus lactis* and enterotoxin B on *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 1, n. 3, p. 277-9, 1972.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <http://www.profigen.com.br/ler/1/355/306/fusarium>. Acesso em: 10 jan. 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 39.

JOZALA, A. F. **Produção e purificação de nisina produzida por *Lactococcus lactis* em leite desnatado e soro de leite**. 2009. 122f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2187-2200, 2018.

KIVANÇ, M.; FUNDA, E. G. A functional food: a traditional Tarhana fermentation. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 269-274, 2017.

KOSTINEK, M. H. N.; HANAK, A.; SPECHT, I.; DORTU, C. M.; THORNART, P.; MBUGUA, S.; HOLZAPFEL, W. H.; HERTEL, C.; FRANZ, C. M. A. P. Use of Lactobacillus strains to start cassava fermentations for Gari production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 258-267, 2008.

KUMARIYA, R.; GARSA, A. K.; RAJPUT, Y.; SOOD, S.; AKHTAR, N.; PATEL, S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 171-177, 2019.

LE, B.; YANG, S.-H. Effect of potential probiotic *Leuconostoc mesenteroides* FB111 in prevention of cholesterol absorption by modulating NPC1L1/PPAR α /SREBP-2 pathways in epithelial Caco-2 cells. **International Microbiology**, p. 1-9, 2018.

LEITE, A. L. M. P.; ZANON, C. D.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from cassava root bagasse and peelings. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 962-970, 2017.

LEUSCHNER, R. G. K.; ROBINSON, T. P.; HUGAS, M.; COCCONCELLI, P. S.; RICHARD-FORGET, F.; KLEIN, G.; LICHT, T. R.; NGUYEN-THE, C.; QUEROL, A.; RICHARDSON, M.; SUAREZ, J. E.; THRANE, U.; VLAK, J. M.; WRIGHT, A. von. Qualified presumption of safety (QPS): A generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 9, p. 425-435, 2010.

LIEPA, L.; VIDUŽA, M. The effect of peroral administration of lactobacillus fermentum culture on dairy cows health indices. **Macedonian Veterinary Review**, v. 41, n. 2, p. 143-151, 2018.

LIU, S.-Q. **Lactic Acid Bacteria**: *Leuconostoc* spp. In Reference module in food science. Amsterdam: Elsevier, 2016.

LIU, S.-Q.; HOLLAND, R. LEUCONOSTOC spp. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.; FOX, P. F. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. p. 1539-1543. London, UK: Academic Press, 2004.

LIU, S.; HAN, Y.; ZHOU, Z. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 643-651, 2011.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO, B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

MACKLAIM, J. M.; GLOOR, G. B.; ANUKAM, K. C.; CRIBBY, S.; REID, G. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. suppl. 1, p. 4688-4695, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MASUDA, Y.; ONO, H.; KITAGAWA, H.; ITO, H.; MU, F.; SAWA, N.; ZENDO, T.;

SONOMOTO, K. Identification and Characterization of Leucocyclicin Q, a Novel Cyclic Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 8164-8170, 2011.

MATHIEU, F.; SUWANDHI, I. S.; REKHIF, N.; MILLIÈRE, J. B.; LEFEBVRE, G. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. **The Journal of applied bacteriology**, v. 74, n. 4, p. 372-379, 1993.

MCAULIFFE, O. Genetics of Lactic Acid Bacteria. **Cheese**, v. XX, n. XX, p. 227-247, 2017.

MOJGANI, N.; SABIRI, G.; ASHTIANI, M.; TORSHIZI, M. Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus brevis* NM 24 and *L.fermentum* NM 332 Isolated from Green Olives in Iran. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 6, n. 2, 2012.

MONTERSINO, S.; PRIETO, A.; MUNOZ, R.; RIVAS, B. de L. Evaluation of Exopolysaccharide Production by *Leuconostoc mesenteroides* Strains Isolated from Wine. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. M196–M199, 2008.

MORAČANIN, S. V.; TURUBATOVIC, L.; SKRINJAR, M. 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 and Biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 247-256, 2013.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Bacteriocinas de bactérias lácticas: Utilização em laticínios e fatores que afetam a sua eficiência. **Infobibos**, p. 1-5, 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/bacteriocinas/index.htm>. Acesso em: 10 jan. 2020.

MORGAN, N. K.; CHOCT, M. Cassava: Nutrient composition and nutritive value in poultry diets. **Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)**, v. 2, n. 4, p. 253-261, 2016.

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*. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 297-306, 2015.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

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 Gut-Derived Strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 12, p. 3953-3960, 2015.

OHIMAIN, E. I.; SILAS-OLU, D. I.; ZIPAMOH, J. T. Biowastes Generation by Small Scale Cassava Processing Centres in Wilberforce Island, Bayelsa State, Nigeria. **Greener Journal of Environmental Management and Public Safety**, v. 2, n. 1, p. 51-59, 2013.

OKUDOH, V.; TROIS, C.; WORKNEH, T. S.; SCHMIDT, S. The potential of cassava biomass and applicable technologies for sustainable biogas production in South Africa: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 1035-1052, 2014.

OLIVEIRA, M. A.; REIS, E. M.; NOZAKI, J. Biological treatment of wastewater from the cassava meal industry. **Environmental Research**, v. 85, n. 2, p. 177-183, 2001.

OLUGBEMI, T. S.; MUTAYOBA, S. K.; LEKULE, F. P. Effect of Moringa (*Moringa oleifera*) inclusion in cassava based diets fed to broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 4, p. 363-367, 2010.

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**, v. 65, n. 5, p. 388-394, 2018.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; NIGAM, P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; VANDENBERGHE, L.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2000.

PAPAGIANNI, M.; AVRAMIDIS, N.; FILIOUSSIS, G.; DASIOU, D.; AMBROSIADIS, I. Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism". **Microbial cell factories**, v. 5, p. 30, 2006.

PAPATHANASOPOULOS, M.; KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A.-M.; LEFEBVRE, G.; CAER, J. P. le.; HOLY, A. von; HASTINGS, J. W. Multiple Bacteriocin Production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and Other *Leuconostoc/Weissella* Strains. **Current Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 331-335, 1997.

PASCUAL, L. M.; DANIELE, M. B.; GIORDANO, W.; PÁJARO, M. C.; BARBERIS, I. L. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. **Current microbiology**, v. 56, n. 4, p. 397-402, 2008.

PAULA, A. T. de; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; TODOROV, S. D.; PENNA, A. L. B. The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. **Food Reviews International**, v. 31, n. 2, p. 147-171, 2015.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PÉREZ-SÁNCHEZ, T.; BALCÁZAR, J. L.; MERRIFIELD, D. L.; CARNEVALI, O./GIOACCHINI, G.; BLAS, I. de; RUIZ-ZARZUELA, I. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 2, p. 196-201, 2011.

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.

RAMOS, C. L.; SOUSA, E. S. O. de; RIBEIRO, J.; ALMEIDA, T. M. M.; SANTOS, C. C. A. do. A.; ABEGG, M. A.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical characteristics of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. **Food Microbiology**, v. 49, p. 182-188, 2015.

RANI, P. S.; AGRAWAL, R. Effect on Cellular Membrane Fatty Acids in the Stressed Cells of *Leuconostoc Mesenteroides*: a Native Probiotic Lactic Acid Bacteria. **Food Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 47-63, 21 fev. 2008.

REBELLO, F. D. F. P.; GASPAR, A. Microorganismos e seus metabólitos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Agrogeoambiental**, v. 2, n. 1, 2010.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S.; PENNA, A. L. B. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p. 124-140, 2012.

REVOL-JUNELLES, A.-M.; MATHIS, R.; KRIER, F.; FLEURY, Y.; DELFOUR, A.; LEEBVRE, G. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. **Letters in applied microbiology**, v. 23, n. 2, p. 120-124, 1996.

SABIA, C.; ANACARSO, I.; BERGONZINI, A.; GARGIULO, R.; SARTI, M.; CONDÒ, C.; MESSI, P.; NIDERHAUSERN, S. de; ISEPPI, R.; BONDI, M. Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolated from human vaginal secretions. **Anaerobe**, v. 26, p. 41-45, 2014.

SAUER, M.; RUSSMAYER, H.; GABHERR, R.; PETERBAUER, C. K.; MARX, H. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 756-769, 2017.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 5, p. 158-164, 1996.

SHAH, N. P.; DAVE, R. I. Characteristics of Bacteriocin Like Inhibitory Substances Produced by *Lactobacillus acidophilus* (BDLA-1, 2409 and MOLA-2), *Lactobacillus fermentum* (5174) and *Lactobacillus plantarum* (2903). **Bioscience and Microflora**, v. 18, n. 2, p. 109-117, 1999.

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**. [s.l.] InTech, 2013.

SILVA, B. T. **Produção de ácido propiônico usando ácido láctico fermentado dos açúcares da cana-de-açúcar**. 2013. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2013.

SLOVER, C. M. *Lactobacillus*: a Review. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, n. 4, p. 23-27, 2008.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, 2003.

SOUTO, L. R. F.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M. S.; FIORDA, F. A.; GARCIA, M. C. Utilization of residue from cassava starch processing for production of fermentable sugar by enzymatic hydrolysis. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 19-24, 2016.

STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: a review. **Food Microbiology**, v. 61, p. 33-49, 2017.

TANIZAWA, Y.; KOBAYASHI, H.; KAMINUMA, E.; SAKAMOTO, M.; OHKUMA, M.; NAKAMURA, Y.; ARITA, M.; TOHNO, M. Genomic characterization reconfirms the

taxonomic status of *Lactobacillus parakefiri*. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 36, n. 3, p. 129-134, 2017.

TAPPIBAN, P.; SMITH, D.; TRIWITAYAKORN, K.; BAO, J. Recent understanding of starch biosynthesis in cassava for quality improvement: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 167-180, 2019.

THUNELL, R. K. Taxonomy of the *Leuconostocs*. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2514-2522, 1995.

TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 209-21, 2009.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 661-670, 2008.

TORRES, D. G. B.; LUCAS, S. D. M.; ANDREANI, C. L.; CARVALHO, K. Q. de; 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**, v. 37, n. 1, p. 160-172, 2017.

VILVERT, R. M. **Obtenção de bacteriocina de bactérias lácticas em água residuária de indústria de fécula de mandioca**. 2019. 93f. Tese (Doutorado em engenharia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Unioeste - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2019.

WANG, M.; GAO, Z.; ZHANG, Y.; PAN, L. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5691-5701, 2016.

WANNUN, P.; PIWAT, S.; TEANPAISAN, R. Purification, Characterization, and Optimum Conditions of Fermentin SD11, a Bacteriocin Produced by Human Orally *Lactobacillus fermentum* SD11. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 4, p. 572-582, 2016.

WAYAH, S. B.; PHILIP, K. Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermentin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, 2018.

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, n. 2, p. 194-203, 2008.

YAN, T. R.; LEE, C. S. Characterization of a partially purified bacteriocin, Fermentin B, from *Lactobacillus fermentum*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 8, p. 741-744, 1997.

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 and Antimicrobial Proteins**, v. 4, n. 3, p. 187-197, 2012.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; BAO, Y.; ZHANG, H.-P. Influence of pH, heat and enzymatic treatments

on the activity of antibacterial substance in MRS and milk media produced by lactobacillus fermentum F6. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 6, p. 911-920, 2010.

ZHAO, Y.; HONG, K.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; ZHAI, Q.; CHEN, W. Lactobacillus fermentum and its potential immunomodulatory properties. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 21-32, 2019.

ZHENG, J.; RUAN, L.; SUN, M.; GÄNZLE, M. A genomic view of lactobacilli and pediococci demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7233-7243, 2015.

ZHOU, X.; LI, Y. (Ed.) **Atlas of Oral Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2015.

ZOU, J.; JIANG, H.; CHENG, H.; FANG, J.; HUANG, G. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, n. 2017, p. 781-789, 2018.

ARTIGO 1: *Lactobacillus fermentum* COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

RESUMO: A crescente tendência da biopreservação nos alimentos estimulou a busca por antimicrobianos alternativos. Bactérias do Ácido Lático (BAL) e/ou seus metabólitos, como as bacteriocinas, representam uma forma biotecnológica para segurança alimentar. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar o potencial biopreservador de uma cepa de bactéria do ácido lático com produção bacteriocina, utilizando como meio de cultivo a água residuária de indústria de fécula de mandioca, bem como otimizar o processo de produção. Inicialmente foi realizado o isolamento de cepas do resíduo da agroindústria processadora de mandioca com potencial de produção de bacteriocinas. Obtida a cepa, foi realizada a identificação pelo sequenciamento genético 16s, encontrando a BAL *Lactobacillus fermentum*. Para selecionar os fatores que exerciam influência na produção de bacteriocinas por *L. fermentum* em água residuária de fecularia de mandioca foi realizado um delineamento experimental Plackett-Burman (PB) com 5 variáveis independentes (sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e Tween 80) e tempo de cultivo de 36 horas sob agitação. A partir do PB, verificou-se que apenas sacarose, extrato de levedura e Tween 80 foram significativos a 90% de confiabilidade. Na sequência, foi realizado o estudo cinético por um período de 35 horas sob agitação, o qual indicou que o melhor tempo de cultivo era de 20 h. Para a otimização foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a partir das variáveis selecionadas no PB, com o tempo de 20 h. Todos os fatores foram significativos no DCCR a 90%, porém o Tween 80 exerceu maior influência. Além da produção de bacteriocinas, outras variáveis respostas foram avaliadas, tais como: produção de ácido lático, pH, massa seca, eficiência de remoção de DQO e açúcar. Verificou-se que para a produção máxima de bacteriocinas (11751,03 AU/mL) por *L. fermentum* em água residuária de fécula de mandioca.

Palavras-chave: Bactérias do ácido lático; *Lactobacillus fermentum*; Resíduos agroindustriais.

5.1 Introdução

Com a crescente conscientização dos consumidores por uma vida saudável e conseqüentemente o aumento da demanda do mercado mundial por alimentos naturais, ampliaram-se as buscas por novas tecnologias e produtos para conservação destes (AYODEJI et al., 2017). Os peptídeos antimicrobianos de bactérias do ácido lático, como as bacteriocinas, podem ser utilizados na biopreservação dos alimentos (WAYAH; PHILIP, 2018).

Bacteriocinas são moléculas catiônicas que possuem a capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas, apresentam resistência a altas temperaturas e pH ácidos (CHIKINDAS et al., 2018; PAULA et al., 2015; GHARSALLAOUI et al., 2016). Bacteriocinas detêm grande potencial para substituição dos antibióticos e conservantes químicos para alimentos (CAVERA et al., 2015; CAVICCHIOLI et al., 2018). Geralmente possuem ação rápida e são conhecidas como seguras (“Generally Recognized as Safe” – GRAS), facilitando aplicações nos alimentos (BALI et al., 2016; CHIKINDAS et al., 2018).

Lactobacillus são encontrados em diferentes habitats, sendo membros importantes das microbiotas animal e humana, bem como do meio ambiente. Em consequência da associação com seres humanos e como matéria prima na indústria alimentícia, esses organismos estão presentes nos alimentos fermentados (ZHENG et al., 2015). As bactérias desse gênero são Gram-positivas, não formadoras de esporos, aerotolerantes, podem ser homofermentativas ou heterofermentativas, tolerantes a um pH ácido e produzem ácido láctico (DOWARAH; VERMA; AGARWAL, 2017; DUAR et al., 2017; SLOVER, 2008; STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017).

A espécie *Lactobacillus fermentum* é amplamente conhecida e considerada como uma cepa probiótica segura, uma vez que o seu uso aparentemente não indica efeitos negativos, sendo utilizada em diversos alimentos para consumo humano (ZHANG et al., 2010). Em 2009 foi incluída no “Qualified Presumption of Safety” (QPS) pela European Food Safety Authority (EFSA) (LEUSCHNER et al., 2010), em 2011 foi adicionada na lista de bactérias que podem ser utilizadas em alimentos na China e em 2013 foi classificada como organismos geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pela US Food and Drug Administration (FDA) (ZHAO et al., 2019).

As cepas de *L. fermentum* são estáveis ao calor, peptídeos de baixa massa molecular (<7000- Da), possuem estabilidade em variações do pH (4,0 – 7,0) e, de acordo com essas características, as bacteriocinas de *L. fermentum* pertencem às bacteriocinas de bactérias do ácido láctico da classe II (PASCUAL et al., 2008). O potencial de *Lactobacillus fermentum* para a produção de bacteriocinas ainda não foi muito explorado; as que foram identificadas são: bacteriocina L23 (PASCUAL et al., 2008), bacteriocina CS57 (SABIA et al., 2014), bacteriocina NM 332 (MOJGANI et al., 2012), BLIS LF5174 (SHAH; DAVE, 1999), fermenticina SD11 (WANNUN; PIWAT; TEANPAISAN, 2016), fermenticina B (YAN; LEE, 1997) e fermenticina SA715 (WAYAH; PHILIP, 2018).

O isolamento e a triagem de bactérias lácticas provenientes de fontes naturais é uma estratégia para obter cepas bacterianas úteis e geneticamente estáveis (AYODEJI et al., 2017). Resíduos naturais como da indústria processadora de mandioca estão frequentemente relacionados à presença de bactérias lácticas (ADEDOKUN et al., 2016b; AYODEJI et al., 2017; ELIJAH et al., 2014; KOSTINEK et al., 2008; PENIDO et al., 2018) e podem servir como substrato para a produção de bacteriocinas (GOMES et al., 2016; VILVERT, 2019).

Considerando a importância de se avaliar o potencial de produção de bacteriocinas a partir de *L. fermentum*, cepa previamente isolada de resíduo do processamento de mandioca, foi utilizada a água residuária da indústria de fécula de mandioca como substrato

para meio de cultivo. Para tanto, utilizou-se do delineamento experimental Plackett-Burman (PB) para selecionar os fatores que influenciam diretamente na produção de bacteriocinas e do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização da produção.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Coleta de resíduos

Para o isolamento das bactérias lácticas foi coletada água residuária de uma indústria de fécula de mandioca do estado de São Paulo – Brasil, por esta apresentar em sua composição bacteriocinas (GOMES et al., 2016). A água residuária utilizada como substrato no cultivo foi coletada em uma fecularia da região do Oeste do Paraná, sendo homogeneizada, caracterizada e então congelada até o momento do seu uso.

5.2.2 Caracterização físico-química da água residuária de indústria de fécula de mandioca

A caracterização físico-química da água residuária da fecularia de mandioca foi realizada por meio de parâmetros pré-estabelecidos (Tabela 1). Os métodos utilizados para a realização das análises são descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (EATON; CLESCERI; GREENBERG, 2005), com exceção dos açúcares totais, que foram determinados por Dubois et al. (1956).

Tabela 1 Composição físico-química da água residuária da indústria de fécula de mandioca

Parâmetro	Água residuária
pH	4,02
DQO bruta	7741,13 (mg L ⁻¹)
DQO filtrada	4172,70 (mg L ⁻¹)
Carbono orgânico total	4115,00 (g L ⁻¹)
Nitrogênio amoniacal	14,98 (mg L ⁻¹)
Nitrogênio total	246,40 (mg L ⁻¹)
Açúcares totais	5007,19 (mg L ⁻¹)
Ácido láctico	3830,00 (mg L ⁻¹)
Ácido acético	1053,94 (mg L ⁻¹)
Sólidos totais	6817,33 (mg L ⁻¹)
Sólidos suspensos totais	1250,00 (mg L ⁻¹)

Legenda: DQO: Demanda química de oxigênio.

5.2.3 Isolamento, caracterização e identificação das bactérias do ácido láctico a partir dos resíduos do processamento da mandioca

O isolamento das bactérias do ácido láctico a partir da água residuária de indústria de farinha de mandioca foi realizado a partir de metodologias adaptadas de Bernardo et al. (2013); Fujimoto et al. (2014) e Vilvert (2019). Inicialmente, alíquotas de 2 mL da água residuária foram inoculadas em Erlenmeyers de 100 mL contendo 18 mL de caldo M17 da marca Sigma-Aldrich® e incubadas em agitador rotacional (shaker) a 35 °C, 150 rpm por 24 horas.

Após o processo de cultivo, foi retirada uma alíquota de 1 mL do caldo fermentado e adicionado 9 mL de água peptonada autoclavada, realizando-se diluições em série de fator 10^{-1} até 10^{-5} . Com o objetivo de obter colônias isoladas de bactérias foi realizada a técnica de semeadura em placa Pour Plate, em que foi utilizado 100 µL das respectivas diluições para o plaqueamento em meio ágar M17, levando para a incubação a 35 °C por 48 horas. Foram selecionadas, aleatoriamente, colônias que estavam com sua morfologia bem formada, com formato circular e de aparência branca acinzentada (ZHOU; LI, 2015). As colônias foram purificadas pelo método de esgotamento por estria, em placas de Petri contendo meio M17 ágar e incubadas novamente a 35 °C por 48 horas.

Após a obtenção do isolado, as colônias foram caracterizadas segundo sua morfologia e características bioquímicas, a partir da coloração de Gram, produção de catalase e teste de antagonismo em relação à vancomicina. A partir das colônias isoladas foi preparado o inóculo em caldo MRS da marca EMD Millipore®, sendo incubado a 30 °C, 100 rpm por 16 horas ou até atingir a densidade óptica de 1,0 (660 nm).

O isolado tinha um grande potencial para a produção de bacteriocinas a partir dos ensaios realizados (item 5.2.6); assim, foi realizado um sequenciamento genético da cepa. A região variável V3-V4 do gene ribossomal 16s foi amplificada por PCR para o sequenciamento de amplicons 16s rRNA com uma cobertura de sequenciamento de 10 mil reads, e sequenciadas por meio da plataforma Illumina Miseq, pela empresa Neoprosecta.

5.2.4 Delineamento experimental para a produção de bacteriocinas

5.2.4.1 Plackett & Burman (PB)

Com o intuito de verificar as variáveis independentes que poderiam ter efeito significativo na produção de bacteriocinas, foi utilizado o planejamento experimental Plackett-Burman (PB). Esse experimento é adequado a fim de estudar de forma eficiente e

econômica o efeito dos fatores (KARLAPUDI et al., 2018). No PB foram avaliadas cinco variáveis independentes: sacarose (marca Dinâmica®), extrato de levedura (marca NEOGEN®), fosfato de potássio, sulfato de magnésio (marca Alphatec®) e polissorbato Tween 80.

As variáveis foram selecionadas com base na revisão de literatura, identificadas como fatores que exercem influência na produção de bacteriocinas (AMIALI; LACROIX; SIMARD, 1998; CABO et al., 2001; CHANDRAPATI; O'SULLIVAN, 1998; CHEIGH et al., 2002; DABA et al., 1993; GUERRA; RUA; PASTRANA, 2001; LIU et al., 2004; LOSTEINKIT et al., 2001; PARENTE; RICCIARDI, 1999; PONGTHARANGKUL; DEMIRCI, 2006; ŞİMŞEK et al., 2009).

Os ensaios do PB foram realizados a partir de cultivos em frascos de 120mL, sendo cada frasco composto de 45mL de água residuária da indústria de mandioca enriquecida com os fatores do planejamento fatorial conforme está descrito na Tabela 3. O pH foi ajustado para 6 com NaOH 0,2 mol/L, os frascos com o meio de cultivo foram autoclavados a 121 atm, 1 atm por 15 minutos. Após o resfriamento do material foram adicionados 5 mL do inóculo (cerca de 10% v/v), para então serem incubados a 35 °C, a 100 rpm por 36 horas para a fermentação. Após o período de fermentação, o meio fermentado foi centrifugado a 3.200 rpm por 20 min, sendo o sobrenadante retirado e filtrado em filtro de 0,20 µ (Figura 1).

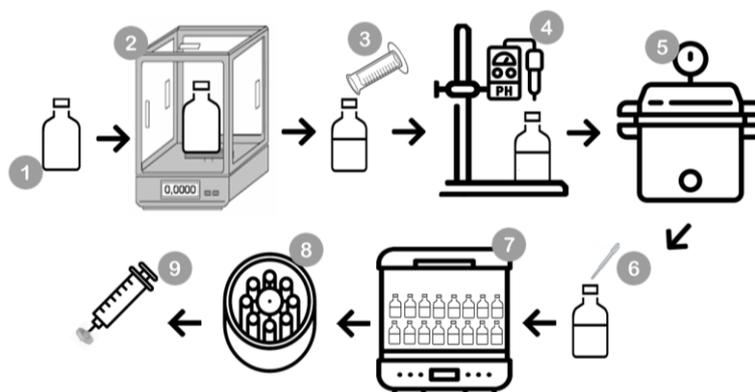


Figura 1 Etapas dos processos envolvidos na produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*. Legenda: 15 frascos (1), pesagem dos nutrientes de acordo com as variáveis do planejamento experimental e transferência para os frascos (2), adição da água residuária (3), ajuste do pH (4), autoclavação (5), adição do inóculo (6), incubação em agitador rotacional shaker (7). Ao término do período de incubação foi realizada a centrifugação (8). O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de uma seringa com filtro 0,20 µm (9). Fonte: Autoria própria (2020).

No sobrenadante foram realizadas análises físico-químicas considerando os seguintes parâmetros: DQO, açúcares totais, ácido lático, ácido acético e bacteriocinas. O precipitado da centrifugação foi utilizado para a quantificação da massa seca, sendo expressa como sólidos totais (ST) (JOZALA, 2005).

Os fatores selecionados para o PB, juntamente com seus valores codificados e reais são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental fatorial Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum*

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Sacarose (g/L)	0	10	20
Extrato de levedura (g/L)	0	7,5	15
Fosfato de potássio (g/L)	0	0,57	1,14
Sulfato de magnésio (g/L)	0	0,57	1,14
Tween 80 (mL/L)	0	2	4

As condições do modelo experimental Plackett-Burman, com 12 ensaios e 3 repetições no ponto central, estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental Plackett-Burman com três repetições no ponto central para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*

Ensaio	Sacarose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Fosfato de potássio (g/L)	Sulfato de magnésio (g/L)	Tween 80 (mL/L)
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

As variáveis respostas avaliadas no PB foram produção de bacteriocinas, produção de ácido láctico, massa seca, pH, eficiência de remoção de DQO e açúcar. Após a realização dos ensaios do PB, foram definidas as variáveis que mais exerciam influência na produção de bacteriocinas. Inicialmente foi calculada a normalidade dos dados pelo software Action Stat® e após foram identificadas as variáveis que exerciam mais influência no intervalo de confiança de 90%, com o auxílio do software Statística® versão 12.0. Segundo Plackett e Burman (1946) e Schoeninger et al. (2014), utilizar o nível de significância a 10% minimiza o risco de excluir fatores importantes para o processo.

5.2.4.2 Obtenção da cinética de produção bacteriocinas

Identificado o ensaio do delineamento experimental PB com maior influência na produção de bacteriocinas, foi realizado o ensaio cinético durante 35 h, com amostras retiradas a cada 5 h, para verificar o melhor tempo de fermentação. Definido o melhor tempo, foi realizado o delineamento composto central e rotacional (DCCR) para otimizar a produção de bacteriocinas.

5.2.4.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi adotado para otimizar a produção de bacteriocinas, sendo aplicado um planejamento fatorial 2^3 ($2 \times 2 \times 2$) composto por 17 ensaios, com oito ensaios nos níveis -1 e +1, seis ensaios na parte axial $-\alpha$ e $+\alpha$ e três repetições do ponto central. As variáveis independentes selecionadas para o DCCR foram: sacarose, extrato de levedura e Tween 80. Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 5.2.4.1 (Figura 1). Na Tabela 4 são apresentados os fatores selecionados, com os valores dos níveis codificados e reais.

Tabela 4 Variáveis independentes e níveis do planejamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*

Variável	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Sacarose (gL^{-1})	0	5,05	12,50	19,94	25,00
Extrato de levedura (gL^{-1})	0	4,04	10,00	15,95	20,00
Tween 80 (mLL^{-1})	2,00	3,21	5,00	6,78	8,00

Na Tabela 5 são apresentadas as condições experimentais do DCCR considerando os 17 ensaios.

Tabela 5 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental composto central rotacional (DCCR) com três repetições no ponto central para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*

Ensaio	Sacarose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Tween 80 (mL/L)
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	$-\alpha$	0	0
10	$+\alpha$	0	0

(continua)

Ensaio	Sacarose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	(continuação)
			Tween 80 (mL/L)
11	0	$-\alpha$	0
12	0	$+\alpha$	0
13	0	0	$-\alpha$
14	0	0	$+\alpha$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Os dados obtidos, após a realização do planejamento DCCR 2³, foram analisados com o intuito de calcular os efeitos principais e as interações das variáveis respostas e, a partir deles, foi ajustado um modelo de segunda ordem para correlacionar as variáveis e suas respostas. O ajuste do modelo é descrito pela Equação 1.

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

Em que:

Y - resposta predita de produção de bacteriocina;

β_0 - valor constante do intercepto;

β_i - coeficiente lineares;

x_i - os parâmetros variáveis;

β_{ii} - coeficiente quadrático de x_i ;

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

5.2.4.4 Otimização e validação experimental do DCCR

Primeiramente, com o auxílio do software Action Stat®, foi verificada a normalidade dos dados. Caso não apresentassem normalidade, os dados seriam transformados pela técnica box-cox. Na sequência, com o auxílio do software Statistica®, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para determinar o modelo e coeficientes de regressão.

A qualidade da equação polinomial foi julgada pelo coeficiente de determinação (R^2), e a significância estatística foi verificada pelo teste-F de Fischer. A superfície de resposta e o gráfico de contorno do modelo-predito foram utilizados para avaliar as relações interativas entre as variáveis significativas, com nível de significância de 10%.

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. Os valores são restritos ao intervalo [0,1], onde zero era um valor inaceitável e um era um valor desejável.

5.2.5 Métodos analíticos

O parâmetro pH foi medido a partir do pHmetro de bancada Tec 3MP da marca Tecnal®. A demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV) – Massa seca, foram determinados pelos métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (EATON; CLESCERI; GREENBERG, 2005). As medidas das concentrações dos açúcares totais foram realizadas de acordo com Dubois et al. (1956). Para a análise do ácido láctico, inicialmente as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 μm e acidificadas com solução de H_2SO_4 (2 Mol/L). Após, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), 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 H_2SO_4 em fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 μL (PENTEADO et al., 2013).

5.2.6 Determinação da produção de bacteriocinas

A determinação da produção de bacteriocinas foi realizada pelo método de difusão em ágar descrito por Lewis e Montville (1991). O ágar escolhido para verificar o crescimento das bacteriocinas foi o TSA (Ágar triptona de soja) suplementado com sangue de carneiro em 5% v/v. O *Lactobacillus sakei* (*L. sakei*) foi utilizado como microrganismo indicador da produção de bacteriocinas, de acordo com Bromberg e colaboradores (2006), na produção da bacteriocina nisina.

O TSA é uma base nutritiva com diversos propósitos, comumente conhecido como ágar digestão enzimática de caseína-soja; esse meio permite a adição de suplementos para reforçá-lo, como o sangue de carneiro, fornecendo um excelente meio não seletivo, utilizado para indicar reações hemolíticas de bactérias (BD, 2013; NEOGEN, 2010).

L.sakei foi cultivado em meio líquido MRS e incubado a 35 °C em 100 rpm. Após 24 h, alíquotas de 10 mL foram retiradas para leitura da densidade óptica (DO) a 660 nm, indicando um valor de 0,4. Uma fração de 100 μL da cultura do *L.sakei* foi espalhada com auxílio da alça de Drigalski na placa de Petri contendo o meio TSA suplementado com sangue de carneiro, já solidificado.

Nas placas de Petri foram inseridos orifícios (poços) de aproximadamente 3 mm de diâmetro na superfície do ágar, com o auxílio de um perfurador de metal estéril. Em seguida, alíquotas de 20 μL do sobrenadante das amostras fermentadas foram adicionadas em cada

orifício. Após os procedimentos citados, as placas foram incubadas na jarra de anaerobiose a 35 °C por 24 horas.

O diâmetro do halo de inibição formado ao redor de cada poço, devido à inibição do crescimento do *L. sakei* pelas bacteriocinas, foi medido com o auxílio de um paquímetro digital, em quatro pontos. A medida média dos halos está relacionada à produção da bacteriocina, sendo expressa em unidades arbitrárias (arbitrary units – AU). Para quantificação da concentração de bacteriocinas foi realizada uma curva padrão a partir da solução comercial da Sigma Aldrich contendo 2,5% de nisina (*Sigma Aldrich*) com um valor de AU correspondente a 10^6 . A curva foi obtida por meio de diluições da nisina padrão em água residuária da mandioca, autoclavada a 121 atm por 15 min, nas concentrações de 10^0 a 10^5 AU/mL. A relação dos diâmetros do halo de inibição gerou uma equação da reta, descrita pela Equação 2.

$$PB = \log_{10}((0,1632*x)+0,6135) \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que:

PB - produção de bacteriocina (AU/mL);
x - medida do halo de inibição (mm).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Isolamento e identificação das cepas de BAL obtidas de resíduos do processamento da mandioca

As bactérias lácticas (BAL) são microrganismos que podem estar vinculados aos resíduos do processamento da mandioca. Adedokun et al. (2016), Ayodeji et al. (2017), Gomes et al. (2016) e Vilvert (2019) relataram a presença de BAL produtoras de bacteriocinas nesses resíduos.

A colônia isolada da água residuária da indústria de farinha de mandioca com potencial para a produção de bacteriocinas foi cuidadosamente identificada por estudos de características e por sequenciamento genético. A colônia isolada apresentou uma tonalidade branca acinzentada (Figura 2a), morfologia bacilos Gram-positivo (Figura 2b), com reação negativa para catalase, com inibição do crescimento de *Lactococcus sakei* em teste de antagonismo (Figura 2c) e certa sensibilidade ao antibiótico Vancomicina (Figura 2d).

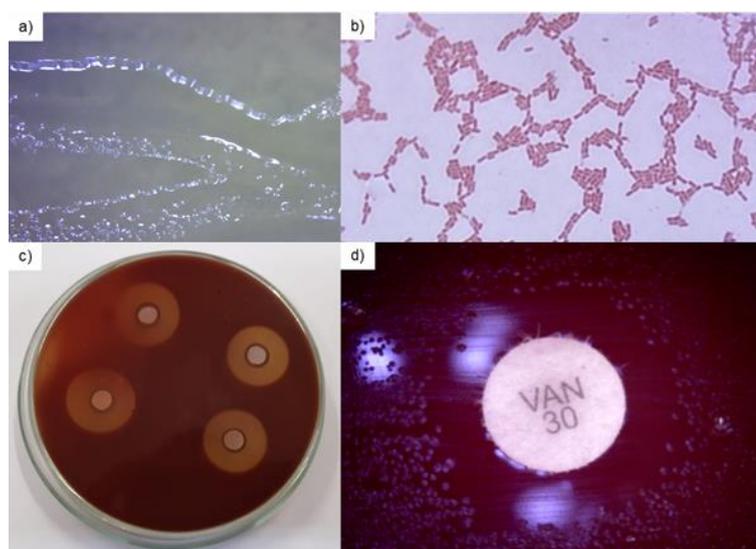


Figura 2 Bactéria do ácido láctico isolada da água residuária da fécula de mandioca com potencial para a produção de bacteriocinas.

Legenda: a) forma branca acinzentada; b) bacilos Gram-positivos; c) teste de antagonismo com formação do halo de inibição do crescimento de *Lactococcus sakei* em ágar TSA suplementado com sangue de carneiro; d) teste de antagonismo em relação à vancomicina com formação do halo de inibição do crescimento da bactéria isolada. Fonte: Autoria própria (2020).

A bactéria isolada foi caracterizada como bactéria do ácido láctico pelo sequenciamento genético 16S (V3-V4), sendo identificada como *Lactobacillus fermentum*. O sequenciamento de dados do isolado apresentou 99,48% de homologia com essa espécie e foi determinado por meio da plataforma Illumina Miseq pela empresa Neopropecta, após uma análise de bioinformática básica para a classificação taxonômica dos reads.

Segundo Liepa e Viduža (2018), a bactéria *L. fermentum* possui atividade antioxidante e antimicrobiana, sendo identificada como um probiótico. Adedokun et al. (2016) avaliaram a atividade antifúngica dessa bactéria em alimentos e verificaram que a cepa possuía características biopreservativas no alimento, sendo capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium expansum*.

L. fermentum apresentou potencial para produção de bacteriocinas, devido ao teste de antagonismo com formação de halo de inibição do crescimento de *Lactococcus sakei* (Figura 2c). Ayodeji et al. (2017) avaliaram a produção de bacteriocinas a partir do *L. fermentum* utilizando produtos da mandioca e verificaram a atividade antibacteriana devido à formação de halos de inibição em relação a microrganismos patogênicos, como a *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Yersinia enterocolitica*. A atividade antibacteriana é uma propriedade desejável para microrganismos com potencial de produção de bacteriocinas e probióticos, uma vez que reduz o crescimento de patógenos (ARCHER; HALAMI, 2015; ÖZEL et al., 2018).

5.3.2 Produção de bacteriocinas

A produção de bacteriocinas a partir de *Lactobacillus fermentum* necessita de meios de crescimento complexos, como o Man Rogosa Sharpe (MRS, meio desenvolvido principalmente para o cultivo de lactobacilos) (CORRY; CURTIS; BAIRD, 2003). No entanto, o alto custo para obtenção desse meio pode inviabilizar a produção em grande escala; assim, a utilização de resíduos com potencial biotecnológico, como a água residuária da fécula de mandioca, pode ser adequada para a produção de bacteriocinas (GOMES et al., 2016), uma vez que agrega valor ao resíduo e permite o seu aproveitamento. Na Tabela 6 são apresentados os dados relativos à produção de bacteriocinas no meio sintético e no natural em 36 horas de fermentação, com um n amostral de 4 amostras de cada.

Tabela 6 Produção de bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* no meio sintético e natural em 36 horas de fermentação

Meio seletivo	Produção de bacteriocinas (AU/mL)	Massa seca (g/L)
Sintético (MRS)	145,84	0,55
Natural (Água residuária da fécula de mandioca)	135,95	0,63

Os valores de produção de bacteriocinas para ambos os meios não apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste de comparação de média (t-student), tendo valores próximos de produção a 95% de significância, com p-valor de $0,072 > 0,05$. Dessa forma, é interessante utilizar o meio de cultivo natural com água residuária da fécula de mandioca para a produção de bacteriocinas.

A água residuária da fécula de mandioca possui alta concentração de nutrientes, como potássio, fósforo, cálcio, magnésio, zinco, manganês, cobre, ferro e nitrogênio (BEZERRA et al., 2019; CARVALHO et al., 2018). O uso desse resíduo possui diversas aplicações, como na produção de hidrogênio (ANDREANI et al., 2019), adubação (BEZERRA et al., 2017), irrigação (POLTHANEE; SRISUTHAM, 2018), biofertilizante (NEVES et al., 2017), bioinseticida (CARVALHO et al., 2017), na produção de biomassa com potencial para produção de biogás (OKUDOH et al., 2014), cultivo de levedura para geração de carotenóides e ácidos graxos (RIBEIRO et al., 2019) e produção de bacteriocinas (VILVERT, 2019), etc.

5.3.3 Otimização e validação experimental

5.3.3.1 Plackett - Burman (PB)

A partir do delineamento experimental Plackett-Burman (PB), foram avaliadas as respostas das variáveis dependentes (produção bacteriocina), eficiência de remoção de DQO e açúcares, massa seca e produção de ácido lático em relação às variáveis independentes (sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e Tween 80 – Tabela 2), sendo demonstradas na Tabela 7. O uso de substratos reais pode aumentar em até duas vezes a produção de bacteriocina no caldo MRS, nas mesmas condições (MALHEIROS et al., 2015).

Tabela 7 Variáveis respostas do delineamento experimental Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*

Ensaio	Produção bacteriocina (AU/mL)	Eficiência de remoção de DQO (%)	Eficiência de remoção de açúcares (%)	Massa seca (g/L)	Produção de Ácido lático (g/L)	pH final
1	2090,12	59,32	7,05	1,27	15,34	4,21
2	1446,23	59,06	79,59	1,43	18,67	4,08
3	442,33	53,92	23,96	0,88	6,92	4,85
4	142,73	48,29	5,82	1,33	15,77	4,37
5	886,48	62,55	62,21	2,00	21,26	4,03
6	2572,41	63,41	62,91	2,37	21,41	4,00
7	174,68	60,47	18,05	0,98	7,34	4,58
8	2828,45	16,37	6,14	0,62	5,78	4,19
9	2293,85	54,05	6,18	0,55	5,84	4,22
10	3438,84	58,99	10,52	1,29	16,06	4,23
11	157,68	45,18	10,36	1,00	9,64	4,95
12	135,93	15,26	19,91	0,64	5,90	4,23
13	1050,79	55,98	62,08	1,92	17,15	4,31
14	1505,84	45,55	57,36	2,00	19,00	4,32
15	1841,16	45,29	55,98	1,81	20,02	4,32

Na Figura 3 são apresentados os gráficos de Pareto, que demonstram os efeitos das variáveis independentes na produção de bacteriocinas (Figura 3a), eficiência de remoção de DQO (Figura 3b), eficiência de remoção de açúcar (Figura 3c) e produção de ácido lático (Figura 3d) no delineamento PB.

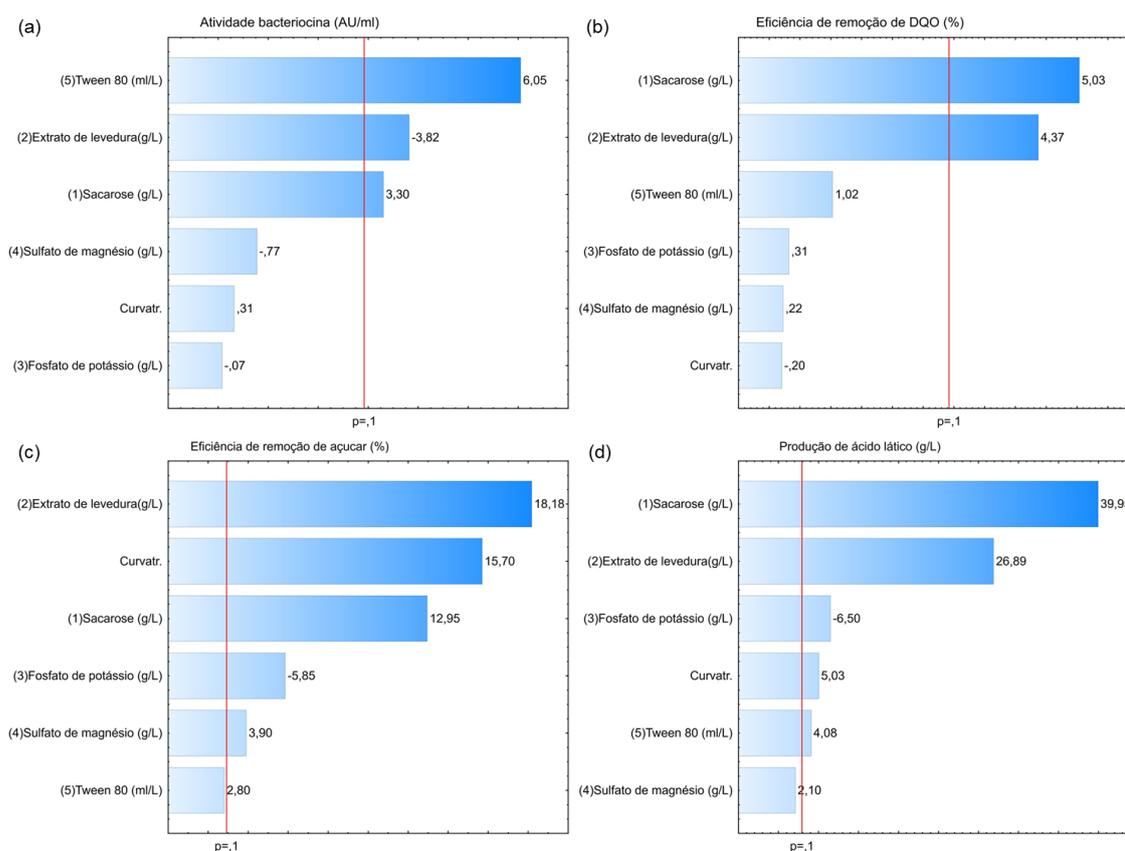


Figura 3 Gráficos de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*.

A produção de bacteriocinas nos diferentes ensaios variou entre 135,93 AU/mL (ensaio 12) e 3438,84 AU/mL (ensaio 10). A partir do delineamento PB esperava-se que a produção do ensaio 12 fosse mais baixa comparada aos demais, visto que nesse ensaio não foi adicionado nenhum suplemento. Já no ensaio 10 foram adicionados sacarose e Tween 80, aumentando a produção de bacteriocinas significativamente. Todos os experimentos, nos quais foram adicionados 4 mL/L de Tween 80, apresentaram elevados valores de produção de bacteriocinas.

Os fatores que foram significativos ao nível de 90% para a produção de bacteriocinas são o Tween 80, o extrato de levedura e a sacarose (Figura 2a), sendo esses escolhidos para a realização do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Visto que a *Lactobacillus fermentum* é considerada uma bactéria fastigiosa, que exige condições ideais de nutrientes para o crescimento e o metabolismo celular, pode-se inferir que esses três substratos atendem à necessidade de produção pela bactéria.

No PB foi utilizado o fosfato de potássio pela propriedade tamponante, a fim de retardar a queda do pH causada pela produção do ácido láctico; porém, verificou-se que ele não foi significativo a 90% na produção de bacteriocinas. Ogunbanwo, Sanni e Onilude

(2004), ao avaliarem a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus brevis* utilizando no meio de cultivo o fosfato de potássio, acetato de sódio, sulfato de magnésio e sulfato de manganês, verificaram que esses suplementos também não apresentaram efeitos significativos.

Para o sulfato de magnésio, verificou-se que também não houve influência a 90% de significância, esse substrato foi adicionado inicialmente como fonte de metal. Pongtharankul e Demirci (2006) avaliaram quantidades diferentes de sulfato de magnésio no meio para a produção da nisina por *Lactococcus lactis* e verificaram que grandes quantidades desse suplemento ($\geq 0,04\%$ p/v) diminuem drasticamente o crescimento.

A eficiência de remoção da DQO apresentou-se na faixa de 45 a 60%, aproximadamente, sendo a menor eficiência no ensaio 12, com 15,26%. Essa baixa eficiência no ensaio 12 pode ser explicada pela falta de nutrientes e condições que as bactérias necessitariam para promover a remoção da DQO. É importante ressaltar que para a água residuária da fécula de mandioca ser descartada nos corpos hídricos é necessário tratar e diminuir o valor da DQO do meio (CAMPOS et al., 2006). Nesse estudo, a eficiência de remoção sendo baixa ou alta não influenciou na produção de bacteriocinas. Vilvert (2019) relatou a mesma situação.

A eficiência de remoção de açúcares mostrou-se diretamente relacionada com as quantidades iniciais de sacarose e extrato de levedura adicionadas no meio de cultivo. Quando essas variáveis foram adicionadas individualmente, observou-se valores baixos de eficiência de remoção de açúcares. No entanto, nos ensaios em que contemplou-se a adição de ambas as variáveis a remoção foi elevada, como no ensaio 2 com 20 g/L de sacarose e 15 g/L de extrato de levedura e remoção de açúcares de 79,59%. Pelo gráfico de Pareto (Figura 3c), verifica-se que as variáveis que mais exerceram influência são a sacarose e o extrato de levedura. No geral, os ensaios que tinham quantidades máximas de sacarose em conjunto com o extrato de levedura apresentaram maior produção de bacteriocinas.

O crescimento celular indicado pela variável massa seca (g/L) está relacionado com a síntese do ácido láctico no processo fermentativo. Assim, não há formação de ácido láctico se o meio não possuir concentrações de nitrogênio e condições como pH e temperatura adequadas para promover o crescimento (PIZATO; OGRODOWSKI; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2015). Na Tabela 7 é possível verificar que quanto maior é a matéria seca, maior é a quantidade de ácido láctico no meio.

Na produção de ácido láctico verifica-se que a variável que mais influenciou significativamente a 90% foi a sacarose. Assim, quanto mais sacarose houver no meio,

maior será a produção de ácido láctico, confirmando a via de fermentação heterofermentativa de *Lactobacillus fermentum* (ZHAO et al., 2019). As maiores produções de ácido láctico foram obtidas nos ensaios 6 e 5 (21,41 e 21,25 g/L, respectivamente), nesses ensaios a variável sacarose estava no maior nível (20 g/L). No geral, a produção de bacteriocinas aumentou quando a produção de ácido láctico aumentou, sendo que a produção do ácido láctico ocorre devido à síntese química ou pelo processo fermentativo das bactérias lácticas, uma vez que esse ácido é um produto metabólico destes microrganismos (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009).

Estudos indicam que valores para o pH inicial (antes da fermentação) entre 5,0 e 6,0 são considerados ótimos para o crescimento e a produção de bacteriocinas (ÖZEL et al., 2018; WANNUN; PIWAT; TEANPAISAN, 2016). O decaimento do pH em todos os ensaios pode ser explicado pela fermentação das amostras, uma vez que ocorre liberação de produtos como ácidos acético, láctico e fórmico (PEREIRA et al., 2016).

5.3.3.2 Cinética da produção de bacteriocinas

Com o intuito de aumentar a produção de bacteriocinas a partir de *Lactobacillus fermentum*, foi realizado um experimento de cinética para identificar o melhor tempo de fermentação, durante 35 horas, com amostras retiradas a cada 5 h, contabilizando 8 pontos amostrais (Figura 4). Nestas amostras foram determinadas bacteriocinas e ácido láctico (Tabela 8).

Tabela 8 Produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum* ao longo do tempo

Tempo de fermentação em horas	Produção de bacteriocina (AU/mL)	Produção de ácido Láctico (g/L)
0	143,13	5,98
5	319,28	7,83
10	702,90	8,07
15	840,26	8,5
20	3009,37	9,43
25	418,48	9,25
30	297,28	8,58
35	253,88	8,94

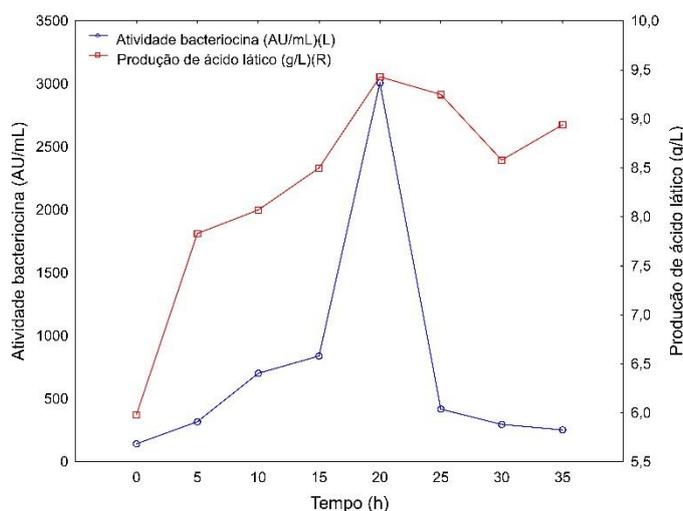


Figura 4 Cinética da produção de bacteriocina por *Lactobacillus fermentum* e produção do ácido láctico em função do tempo

A maior produção de bacteriocinas durante o ensaio cinético ocorreu no tempo de fermentação de 20 horas (3009,37 AU/mL). Neste mesmo tempo ocorreu também a maior produção de ácido láctico (9,43 g/L) (Figura 4). Todorov e Dicks (2005) avaliaram a produção da bacteriocina ST33LD por *Leuconostoc mesenteroides* e identificaram que a maior produção foi de 6400 AU/mL em 20 horas de fermentação em caldo MRS, com pH inicial em 6,0 e final entre 3,65 e 3,86.

Ahn, Kim e Kim (2017) isolaram e caracterizaram uma bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici* do malte e verificaram seu potencial para controlar a deterioração da cerveja. O tempo de fermentação foi de 20 horas, em caldo MRS, obtendo-se a produção máxima de bacteriocinas de 640 AU/mL. Nesse estudo, o uso da água residuária como meio de cultivo foi melhor, uma vez que a produção foi maior.

Estudos que avaliaram a produção de bacteriocinas a partir de *Lactobacillus fermentum* indicam que o tempo de incubação da bactéria pode variar, ou seja, não possui um tempo de fermentação específico, como, por exemplo: 48 h (TOMARO-DUCHESNEAU et al., 2012); 24 h em meio MRS (ADEDOKUN et al., 2016a; AL-MADBOLY; KHEDR; ALI, 2017); 18 h (KALSUM; SJOFJAN, 2012; MELO et al., 2017); e 12 h (LESTARININGTYAS; RIZQIATI,; PRAMONO, 2018).

O decaimento da produção de bacteriocinas ao final do período de fermentação, como pode ser visto na Figura 4, pode ter ocorrido pela degradação da bacteriocina por enzimas proteolíticas, uma vez que essas enzimas quebram ligações peptídicas, degradando as células, e geralmente as bacteriocinas são suscetíveis a essas enzimas (ÖZEL et al., 2018). Diminuições semelhantes da produção de bacteriocinas foram observadas pela bacteriocina F12 de *Lactobacillus plantarum* (SIFOUR et al., 2012) e pela

bacteriocina ST311LD de *Enterococcus faecium* (TODOROV; DICKS, 2005a), ambas cultivadas em caldo MRS.

5.3.3.3 Condições ótimas para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum* pelo Delineamento Composto Central e Rotacional (DCCR)

Como descrito no item 5.3.3.1, para realizar o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foram selecionados os fatores sacarose, extrato de levedura e Tween 80 para avaliar a produção de bacteriocinas a partir de *Lactobacillus fermentum*, bem como foi avaliado a eficiência de remoção de DQO e açúcar, massa seca e produção de ácido láctico. Os valores das variáveis respostas referentes aos 17 níveis do DCCR estão indicados na Tabela 9 e são explicados a partir dos gráficos de Pareto (Figura 5).

Os dados de produção de bacteriocinas foram transformados pelo método box-cox no programa software Statistica® 12.0 para normalizar os dados. Com os dados transformados foi possível avaliar os fatores que exerceram influência significativa na produção de bacteriocinas. Os valores exibidos na Tabela 9 correspondem aos dados não transformados, ou seja, os reais.

Tabela 9 Variáveis respostas do Delineamento Composto Central e Rotacional (DCCR) para o cultivo de *Lactobacillus fermentum*

Ensaio	Produção bacteriocina (AU/mL)	Eficiência de remoção de DQO (%)	Eficiência de remoção de açúcares (%)	Massa seca (g/L)	Produção de Ácido láctico (g/L)	pH final
1	883,98	76,17	28,30	6,77	6,32	4,48
2	414,57	47,83	76,37	4,47	9,64	3,91
3	659,40	42,65	53,12	4,28	6,09	4,69
4	919,56	48,09	75,69	9,84	13,97	4,12
5	1239,72	14,84	40,54	3,18	5,94	4,61
6	1099,26	42,96	54,06	7,67	9,42	4,15
7	1316,55	16,45	12,32	3,86	6,17	4,69
8	2070,58	41,00	58,02	4,99	11,25	4,10
9	5830,53	76,05	47,61	3,14	5,04	4,99
10	4349,23	36,64	59,66	5,66	12,64	4,02
11	7236,82	76,07	35,30	5,10	6,82	4,43
12	5267,98	32,07	78,30	4,55	12,45	4,38
13	1490,36	20,37	83,02	5,01	8,94	4,29
14	11751,03	33,34	73,63	5,14	9,22	4,29
15	4465,15	25,13	68,80	7,83	8,87	4,22
16	4768,66	23,33	64,00	7,97	8,90	4,09
17	4252,26	26,14	69,96	8,68	8,93	4,25

Na Figura 5 são apresentados os gráficos de Pareto, que demonstram os efeitos das variáveis independentes na produção de bacteriocinas (Figura 5a), eficiência de remoção de DQO (Figura 5b), eficiência de remoção de açúcares (Figura 5c) e produção de ácido láctico (Figura 5d) no delineamento DCCR.

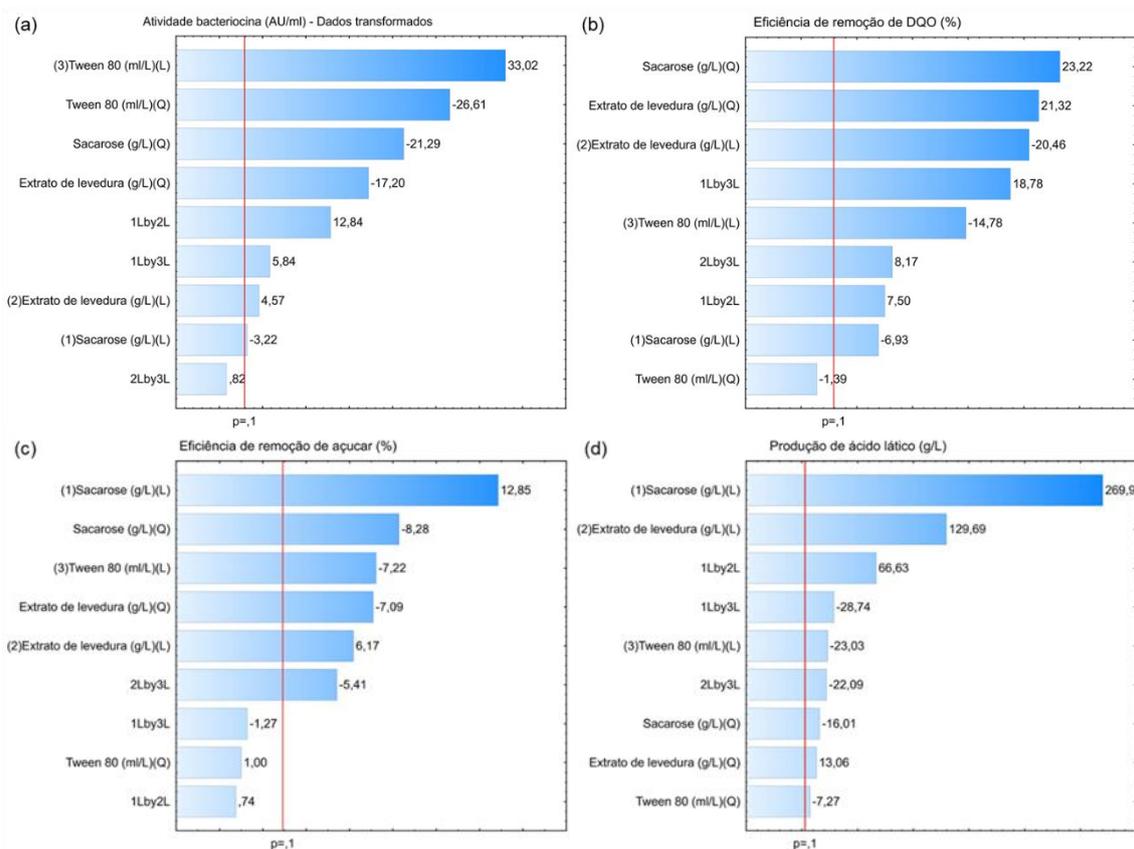


Figura 5 Gráficos de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Delineamento Central Composto Rotacional para o cultivo de *Lactobacillus fermentum*.

A produção de bacteriocinas variou entre os diferentes ensaios, tendo a menor produção no ensaio 2, com 414,57 (AU/mL), e a maior no ensaio 14, com 11751,03 (AU/mL). No ensaio de maior produção de bacteriocinas foi utilizado o maior nível mL/L de Tween 80 (8 mL/L), podendo-se observar, em relação aos outros níveis, que o aumento de produção de bacteriocinas esteve relacionado com o aumento de Tween 80 no meio. Em relação às demais variáveis, extrato de levedura e sacarose, o Tween 80 foi o mais significativo a 90% (Figura 5a).

O aumento da produção de bacteriocinas ao utilizar Tween 80 como suplemento no meio de cultivo ocorre pela sua característica surfactante, uma vez que acelera o crescimento das células, bem como promove um efeito na membrana celular, interferindo na sua permeabilidade e acelerando a difusão da bacteriocina (MARTINEZ et al., 2013; ROSA

et al., 2002). Wayah e Philip (2018) avaliaram que a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum* utilizando Tween 80 aumentou significativamente, bem como indicaram que a sacarose foi a fonte de carbono preferida para o crescimento das bactérias lácticas. Para Von Mollendorff, Todorov e Dicks (2009), a produção da bacteriocina JW15BZ de *Lactobacillus fermentum* isolada de Boza (bebida Balcã produzida por cereais fermentados) aumentou de 3200 AU/mL para 25600 AU/mL utilizando meio sintético MRS suplementado com 0,20 mL/L de Tween 80.

O consumo da sacarose na produção de bacteriocinas indica que esse substrato está sendo usado como fonte de carbono para o crescimento dos microrganismos. Vale ressaltar que a bacteriocina é um produto de metabolismo primário, tendo sua produção influenciada pelo tipo e pela concentração da fonte de carbono (PAPAGIANNI; AVRAMIDIS; FILIOUSIS, 2007). Além de ser consumida, a sacarose pode ser convertida em ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e metabólitos pela via de fermentação heterofermentativa (CÁRDENAS et al., 2015). Em geral, as concentrações ótimas de açúcares para a produção da bacteriocina nisina relatada estavam entre 3 e 4% (PONGTHARANGKUL; DEMIRCI, 2006).

O uso do extrato de levedura no meio de cultivo é definido por ser uma fonte de nitrogênio, que possui aminoácidos essenciais que impulsionam o crescimento e a produção de bacteriocina (WAYAH; PHILIP, 2018). Para Mataragas et al. (2004), avaliando a *Leuconostoc mesenteroides*, ao adicionarem extrato de levedura em conjunto com peptona e glucose, a produção de bacteriocina aumentou de 2560 AU/mL para 5120 AU/mL.

Considerando o gráfico de Pareto (Figura 5b) para eficiência de remoção de DQO, as variáveis mais significativas foram a sacarose e o extrato de levedura, assim como no PB (Figura 3b). O ensaio 1 apresentou o maior valor de remoção de DQO, provavelmente por ter recebido as menores doses de sacarose, extrato de levedura e Tween (5,05 g/L, 4,04 g/L e 3,21 mL/L, respectivamente).

Para a variável resposta eficiência de remoção de açúcares no DCCR (Figura 8c), a variável sacarose foi a mais significativa. O ensaio 14 apresentou uma das maiores remoções de açúcares (73,63%) e a maior produção de bacteriocinas (com 11751,03 AU/mL). Neste ensaio também foi aplicada a maior dosagem de Tween 80 (+ α , 8,0 mL/L).

No DCCR, a variável resposta formação do ácido láctico (Figura 5d) foi influenciada por todas as variáveis, porém as mais significativas foram a sacarose e o extrato de levedura. A menor produção de ácido láctico foi verificada na condição em que o meio não foi suplementado com sacarose (ensaio 9), o que já era esperado, uma vez que a via heterofermentativa do *Lactobacillus fermentum* necessita de uma fonte de carbono para

consumir e convertê-la em ácido láctico (ZHAO et al., 2019). A produção de biomassa e a produção de ácido são variáveis diretamente proporcionais; assim, verifica-se que na condição de maior produção de ácido láctico, ocorreu a maior produção de massa seca (ensaio 4).

Para o pH no DCCR, assim como no PB, os valores finais são menores que os iniciais, uma vez que ocorreu a formação de ácidos pela via heterofermentativa (MADIGAN et al., 2010). O ensaio 2 apresentou o menor valor de pH (3,91) e alta produção de ácido láctico (9648,27 g/L). Já no ensaio 9, que apresentou o maior valor de pH final (4,99), houve a menor produção de ácido láctico (5044,46 g/L) e, conseqüentemente, a menor produção de biomassa (3,14 g/L).

A produção de bacteriocinas nos pontos centrais (níveis 15, 16 e 17) foi de 4465,15; 4768,66; 4252,26 AU/mL, respectivamente. As maiores concentrações de biomassa (massa seca) foram registradas para os ensaios 17, de 8,68 g/L; para o ensaio 15, de 7,83 g/L; e para o ensaio 16, de 4,97 g/L (Tabela 9). A menor concentração de biomassa, nos pontos centrais, correspondeu à melhor produção de bacteriocinas (ensaio 16). Valores próximos nos pontos centrais indicam que o erro experimental foi baixo (MENDONÇA, 2012).

Os resultados significativos das análises dos efeitos lineares e quadráticos para as variáveis sacarose, extrato de levedura e Tween 80 sobre a produção de bacteriocinas são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 Efeitos lineares, quadráticos e das interações do DCCR para a variável resposta produção bacteriocina por *Lactobacillus fermentum*

Fator	Efeito	Erro puro (desvio padrão)	p	Limite de confiança - 90%	Limite de confiança +90%
Média	33351,11*	68,94	0,00	33149,81	33552,41
(1) Sacarose (g/L)(L)	-209,04*	64,79	0,08	-398,21	-19,87
Sacarose (g/L)(Q)	-1519,59*	71,37	0,00	-1728,00	-1311,18
(2) Extrato de levedura (g/L)(L)	296,46*	64,79	0,04	107,28	485,63
Extrato de levedura (g/L)(Q)	-1228,04*	71,37	0,00	-1436,45	-1019,63
(3) Tween 80 (mL/L)(L)	2139,62*	64,79	0,00	1950,44	2328,79
Tween 80 (mL/L)(Q)	-1899,54*	71,37	0,00	-2107,95	-1691,13
Interação 1 x 2	1086,63*	84,61	0,01	839,57	1333,69
Interação 1 x 3	494,81*	84,61	0,03	247,75	741,87
Interação 2 x 3	69,68	84,61	0,50	-177,38	316,74

Nota: *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,10$)

O modelo que descreve o comportamento de produção de bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum*, com base nos fatores sacarose, extrato de levedura, Tween 80 e as interações lineares e quadráticas entre si está descrito na Equação 3.

$$PB = 33351,11 - 104,52A - 759,79A^2 + 148,22Y - 614,01Y^2 + 1069,80Z - 949,77Z^2 + 543,31 A_xY + 247,40 A_xZ \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que:

PB - produção de bacteriocina (Au/mL);

A - sacarose (g/L);

Y- extrato de levedura (g/L);

Z - Tween 80 (mL/L).

O coeficiente de determinação do modelo (R^2) foi de 0,41, ou seja, o modelo consegue explicar cerca de 41% dos dados coletados. Nesse caso, o R^2 foi considerado baixo, uma vez que está abaixo de 70%, porém é importante ressaltar que para verificar o ajuste do modelo não se deve considerar o R^2 unicamente, mas sempre aliado a outros diagnósticos do modelo (NAKAGAWA; JOHNSON; SCHIELZETH, 2017). O modelo foi avaliado por meio da análise de variância (ANOVA – Tabela 11) com um nível de significância de 10%.

Tabela 11 Resumo da análise de variância para o ajuste do modelo para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	Ftab
Regressão	32555039,45	8	4069379,93	0,69	2,59
Resíduo	47325158,88	8	5915644,86		
Falta de ajuste	47296523,61	6	7882753,94	550,56	9,33
Erro puro	28635,27	2	14317,63		
Total	79880198,33	16			

Para definir as variáveis significativas, deve-se atender as seguintes premissas:

- Se $F_{cal} \geq F_{tab}$ ou $p\text{-valor} \leq 10\%$: conclui-se com 10% de significância que existe efeito das variáveis independentes sobre a variável dependente;
- Se $F_{cal} \leq F_{tab}$ ou $p\text{-valor} > 10\%$: conclui-se com 10% de significância que não existe efeito das variáveis independentes sobre a variável dependente.

Nesse caso, verifica-se que estatisticamente a 10% de significância não existe efeito das variáveis independentes (sacarose, extrato de levedura e Tween 80) sobre a variável dependente (produção de bacteriocina) para análise de regressão, uma vez que o valor do $F_{calculado}$ foi menor que o $F_{tabelado}$. Na análise de resíduos verifica-se que com 10% de significância os valores foram significativos. Porém, considerando os valores da ANOVA e o

R^2 , conclui-se que o modelo estatístico gerado não atende inteiramente à produção de bacteriocinas, sendo necessário avaliar as concentrações das variáveis sacarose, extrato de levedura e Tween 80 em trabalhos futuros.

A partir dos resultados do delineamento composto central rotacional, foram geradas as superfícies de resposta e os gráficos de contorno 2D (Figuras 6, 7 e 8). A metodologia de superfície de resposta permite verificar a significância estatística do modelo de regressão da resposta em função da variável dependente, representando-a graficamente (LUCENA et al., 2018).

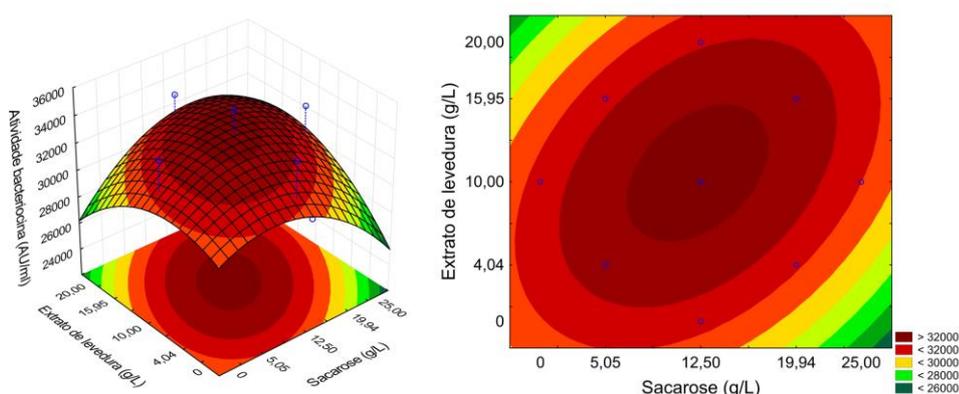


Figura 6 Superfície de resposta e gráficos de contorno correspondentes, mostrando os efeitos do extrato de levedura e sacarose na produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*

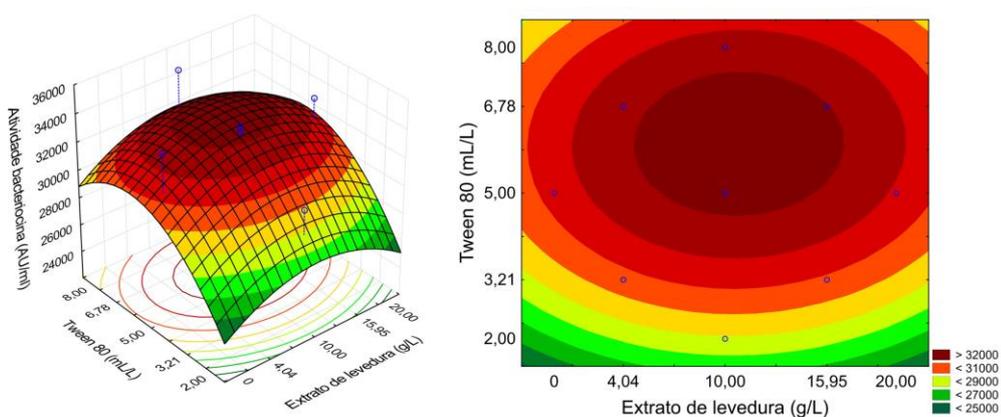


Figura 7 Superfície de resposta e gráficos de contorno correspondentes, mostrando os efeitos da sacarose e Tween 80 na produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*.

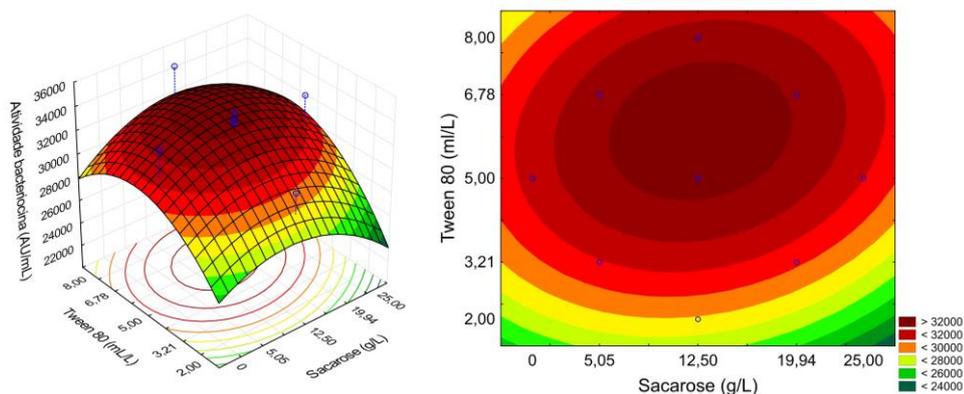


Figura 8 Superfície de resposta e gráficos de contorno correspondentes, mostrando os efeitos do extrato de levedura e Tween 80 na produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*.

A superfície de resposta que correlaciona o extrato de levedura e a sacarose (Figura 6) indica que para melhorar a produção da produção de bacteriocina é necessário utilizar valores dos substratos próximos aos pontos centrais, uma vez que a maior produção está centralizada no gráfico. Para o extrato de levedura a concentração está em torno de 10 g/L e, para a sacarose, em torno de 12,50 g/L.

As superfícies de resposta que correlacionam o extrato de levedura e a sacarose com o Tween 80 (Figuras 7 e 8) indicam que para obter a maior produção de bacteriocinas deve-se aumentar a quantidade de Tween 80 e manter a sacarose e o extrato de levedura próximos do ponto central, ou seja, próximos aos valores médios.

5.3.3.4 Obtenção do ponto ótimo para o processo de produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*

Considerando-se os dados do item anterior, foi possível a obtenção do ponto ótimo para o processo de produção de bacteriocinas, utilizando como substrato a água residuária da indústria de fécula de mandioca. Na Figura 9 são ilustradas as curvas de cada uma das variáveis em análise, em função de cada uma das respostas e a sobreposição desses dados, de maneira que se otimizasse o processo estudado.

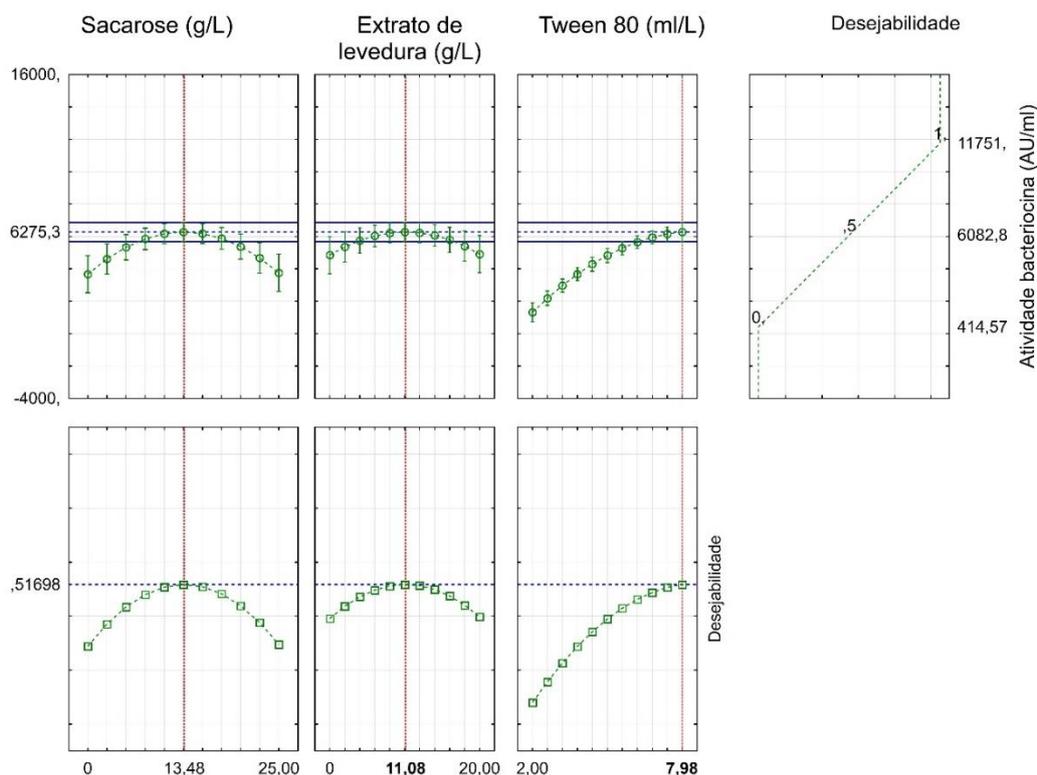


Figura 9 Valores ótimos dos substratos para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*, determinado pelo método de desejabilidade.

No gráfico são apresentadas as condições otimizadas para cada um dos fatores e o valor previsto para a produção de bacteriocinas (Figura 12). A desejabilidade global foi de 51,59%, indicando que nas condições estabelecidas, foi alcançado 51,69% das respostas desejadas (SCHOENINGER et al., 2014). Os valores ótimos para a produção de bacteriocinas devem conter as seguintes concentrações sacarose de 13,48 g/L, extrato de levedura 11,08 g/L e Tween 80 7,98 mL/L, para obtenção de 11751,0 AU/mL de bacteriocinas.

5.4 Conclusões

Nesse experimento foi possível isolar e caracterizar uma cultura de bactéria láctica com potencial de produção de bacteriocinas de resíduos do processamento da mandioca. A bactéria do ácido láctico isolada e utilizada nos ensaios foi identificada por sequenciamento genético 16 S como *Lactobacillus fermentum*. O delineamento Plackett-Burman permitiu a triagem de 3 fatores significativos a 10% na produção de bacteriocinas pela cepa de *Lactobacillus fermentum* em água residuária de indústria de fécula de mandioca, sendo eles: sacarose, extrato de levedura e Tween 80. A condição ótima, definida no delineamento

experimental composto central rotacional, para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum* foi água residuária de fecularia de mandioca suplementada com 13,48 g/L de sacarose, 11,08 g/L de extrato de levedura e 7,98 g/L de Tween 80 em que se obteria 11751,0 AU/mL de bacteriocinas.

5.5 Referências

ADEDOKUN, E. O.; RATHER, I. A.; BAJPAI, V. K.; PARK, Y.-H. Biocontrol efficacy of *Lactobacillus fermentum* YML014 against food spoilage moulds using the tomato puree model. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 1, p. 64-68, 2016.

AHN, H.; KIM, J.; KIM, W. J. Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. **Food Control**, v. 80, p. 59-66, 2017.

AL-MADBOLY, L. A.; KHEDR, E. G.; ALI, S. M. Optimization of Reduced Glutathione Production by a *Lactobacillus plantarum* Isolate Using Plackett–Burman and Box–Behnken Designs. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

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 and Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 887-894, 1998.

ANDREANI, C. L.; TONELLO, T. U.; MARI, A. G.; LEITE, L. C.; CAMPAÑA, H.; LOPES, D. D.; RODRIGUES, J. A.; 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, n. 3, p. 1474-1482, 2019.

ARCHER, A. C.; HALAMI, P. M. Probiotic attributes of *Lactobacillus fermentum* isolated from human feces and dairy products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 8113-8123, 2015.

AYODEJI, B. D.; PICCIRILLO, C.; FERRARO, V.; MOREIRA, P. R.; OBADINA, A. O.; SANNI, L. O.; PINTADO, M. M. E. Screening and molecular identification of lactic acid bacteria from gari and fufu and gari effluents. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 123-133, 2017.

BALI, V.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B.; KENNEDY, J. F. Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 5, p. 817-834, 2016.

BD – BECTON, DICKINSON E COMPANHIA. **Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood**. Alemanha: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.bd.com>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

BERNARDO, M. P.; COELHO, L. F.; LIMA, C. J. B. de; RODOVALHO, C. de M.; OLIVEIRA, P. M. de; PAULA, F. C. de; CONTIERO, J. Isolation and characterization of bacterial producers of optically pure D(-) and L(+) lactic acid. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 21, p. 2618-2628, 2013.

BEZERRA, M. G.; SILVA, G. G. C. da; DIFANTE, G. dos S.; EMERENCIANO NETO, J. V.;

OLIVEIRA, E. M. M.; MORAIS, É. G. Chemical attributes of soil under cassava wastewater application in marandugrass cultivation. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 8, p. 579-585, 2019.

BEZERRA, M. G. S.; SILVA, G. G. C. da; DIFANTE, G. dos S.; EMERENCIANO NETO, J. V.; OLIVEIRA, E. M. M.; OLIVEIRA, L. E. C. de. Cassava wastewater as organic fertilizer in 'marandu' grass pasture. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 6, p. 404-409, 2017.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordnia* e CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

CABO, M. L.; MURADO, M. A.; GONZÁLEZ, M. A. P.; PASTORIZA, L. Effects of aeration and pH gradient on nisin production: a mathematical model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4-5, p. 264-273, 2001.

CAMPOS, A. T.; DAGA, J.; RODRIGUES, E. E.; FRANZENER, G.; SUGUIY, M. M. T.; SYPPERRECK, V. L. G. Tratamento de águas residuárias de fecularia por meio de lagoas de estabilização. **Engenharia Agrícola**, v. 26, n. 1, p. 235-242, 2006.

CÁRDENAS, N.; LAIÑO, J. E.; DELGADO, S.; JIMÉNEZ, E.; VALLE, M. J.; GIORI, G. S. de; SESMA, F.; MAYO, B.; FERNÁNDEZ, L.; LEBLANC, J. G.; RODRÍGUEZ, J. M. Relationships between the genome and some phenotypical properties of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4343-4353, 2015.

CARVALHO, J. C. de; BORGHETTI, I. A.; CARTAS, L. C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Biorefinery integration of microalgae production into cassava processing industry: Potential and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1165-1172, 2018.

CARVALHO, J. D. de; NEVES, F. L.; SILVA, C. D. da; BITTENCOURT, M. A. L. Aspectos biológicos e ação inseticida de espécies vegetais sobre imaturos da mosca-negra-dos-citros (*Aleurocanthus woglumi* Ashby-Hemiptera: Aleyrodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 5, 2017.

CAVERA, V. L.; ARTHUR, T. D.; KASHTANOV, D.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 5, p. 494-501, 2015.

CAVICCHIOLI, V. Q.; CARVALHO, O. V. de; PAIVA, J. C. de; TODOROV, S. D.; SILVA JÚNIOR, A.; NERO, L. A. Inhibition of herpes simplex virus 1 (HSV-1) and poliovirus (PV-1) by bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Enterococcus durans* strains isolated from goat milk. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 1, p. 33-37, 2018.

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, n. 3, p. 229-233, 1998.

CHEIGH, C.-I.; CHOI, H.-J.; PARK, H.; KIM, S.-B.; KOOK, M.-C.; HWANG, J.-K.; PYUN, Y.-

R. 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, n. 3, p. 225-235, 2002.

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

CORRY, J. E. L.; CURTIS, G. D. W.; BAIRD, R. M. **Handbook of Culture Media for Food Microbiology, Second Edition**. [s.l.] Elsevier Science, 2003.

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 and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 166-173, 1993.

DOWARAH, R.; VERMA, A. K.; AGARWAL, N. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: a review. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2017.

DUAR, R. M.; LIN, X. B.; ZHENG, J.; MARTINO, M. E.; GRENIER, T.; PÉREZ-MUÑOZ, F. L.; GÄNZLE, M.; WALTER, J. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 1, p. s27-s48, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th. ed. Washington, DC.: American Public Health Association, 2005.

ELIJAH, A. I.; ATANDA, O. O.; POPOOLA, A. R.; UZOCHUKWU, S. V. A. Molecular Characterization and Potential of Bacterial Species Associated with Cassava Waste. **Nigerian Food Journal**, v. 32, n. 2, p. 56-65, 2014.

FUJIMOTO, R. Y. GABBAY, M. I.; MARTINS, M. L.; BEZERRA, A. M.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P. Isolamento e Seleção de Bactérias Ácido-Láticas com Potencial Probiótico para Pirarucu. **Comunicado Técnico 148**. Embrapa. p. 1-4, 2014.

GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N.; JOLY, C.; DEGRAEVE, P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 8, p. 1262-1274, 2016.

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MAÑUNGA, 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, n. 19, p. 8120-8131, 2016.

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, n. 3, p. 267-281, 2001.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de**

Alimentos, v. 29, n. 4, p. 738-747, 2009.

JOZALA, A. F. **Produção de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado, com ou sem suplementação, como meio de cultivo**. 2005. 93f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

KALSUM, U.; SJOFJAN, O. The Growth of *Lactobacillus fermentum* Isolated from Quail Intestine on Rice Bran Medium. **Journal of Tropical Life Science**, v. 2, n. 3, p. 58-61, 2012.

KARLAPUDI, A. P. et al. Plackett-Burman design for screening of process components and their effects on production of lactase by newly isolated *Bacillus* sp. VUVD101 strain from Dairy effluent. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 543-546, 2018.

KOSTINEK, M. H. N.; HANAK, A.; SPECHT, I.; DORTU, C. M.; THORNART, P.; MBUGUA, S.; HOLZAPFEL, W. H.; HERTEL, C.; FRANZ, C. M. A. P. Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentations for Gari production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 258-267, 2008.

LESTARININGTYAS, R. D.; RIZQIATI, H.; PRAMONO, Y. B. Characteristics of Tomato Probiotic Drink was Fermented by *Lactobacillus fermentum* with Various Incubation Time. **Journal of Applied Food Technology**, v. 4, n. 1, 2018.

LEUSCHNER, R. G. K.; ROBINSON, T. P.; HUGAS, M.; COCCONCELLI, P. S.; RICHARD-FORGET, F.; KLEIN, G.; LICHT, T. R.; NGUYEN-THE, C.; QUEROL, A.; RICHARDSON, M.; SUAREZ, J. E.; THRANE, U.; VLAK, J. M.; WRIGHT, A. von. Qualified presumption of safety (QPS): A generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 9, p. 425-435, 2010.

LEWIS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 2, p. 145-150, 1991.

LIEPA, L.; VIDUŽA, M. The effect of peroral administration of *Lactobacillus fermentum* culture on dairy cows health indices. **Macedonian Veterinary Review**, v. 41, n. 2, p. 143-151, 2018.

LIU, C.; LIU, Y.; LIAO, W.; WEN, Z.; CHEN, S. Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey: optimization of fermentation conditions through statistically based experimental designs. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 113-116, p. 627-638, 2004.

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

LUCENA, L. G.; ROCHA, E. M. R.; SILVA, F. L. H. da; CAHINO, A. M. Otimização multivariada do processo foto-Fenton solar na remoção da demanda química de oxigênio em lixiviados de aterros sanitários. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 3, p. 499-507, 2018.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; CONVERTI, A.; COTTER, P. D.; OLIVEIRA, R. P. S. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 482-488, 2013.

MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H.; TSAKALIDOU, E.; METAXOPOULOS, J. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 191-198, 2004.

MELO, T. A.; SANTOS, T. F. dos; PEREIRA, L.; PASSOS, H. M. Functional Profile Evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: a New Potential Probiotic Strain Isolated during Cocoa Fermentation. **BioMed Research International**, v. 2, p. 1-7, 2017.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Estatística Aplicada e Biometria) - Programa de Pós-Graduação em Estatística Aplicada e Biometria, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

MOJGANI, N.; SABIRI, G.; ASHTIANI, M.; TORSHIZI, M. Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus brevis* NM 24 and *L.fermentum* NM 332 Isolated from Green Olives in Iran. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 6, n. 2, 2012.

NAKAGAWA, S.; JOHNSON, P. C. D.; SCHIELZETH, H. The coefficient of determination R² and intra-class correlation coefficient from generalized linear mixed-effects models revisited and expanded. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 14, n. 134, 2017.

NEOGEN. **Ágar Tryptic Soy – Tryptic Soy Agar (7100)**, 2010. Disponível em: <https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7100_pt_pi.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2020.

NEVES, A. C.; BERGAMINI, C. N.; LEONARDO, R. de O.; GONÇALVES, M. P.; ZENATTI, D. C.; HERMES, E. Effect of biofertilizer obtained by anaerobic digestion of cassava effluent on the development of crambe plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 10, p. 681-685, 2017.

OGUNBANWO, S. T.; SANNI, A. I.; ONILUDE, A. A. Effect of bacteriocinogenic *Lactobacillus* spp. on the shelf life of fufu, a traditional fermented cassava product. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 57-63, 2004.

OKUDOH, V.; TROIS, C.; WORKNEH, T. S.; SCHMIDT, S. The potential of cassava biomass and applicable technologies for sustainable biogas production in South Africa: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 1035-1052, 2014.

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

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, n. 6, p. 1557-1563, 2007.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 52, n. 5, p. 628-638, 1999.

PASCUAL, L. M.; DANIELE, M. B.; GIORDANO, W.; PÁJARO, M. C.; BARBERIS, I. L. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. **Current microbiology**, v. 56, n. 4, p. 397-402, 2008.

PAULA, A. T. de; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; TODOROV, S. D.; PENNA, A. L. B. The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. **Food Reviews International**, v. 31, n. 2, p. 147-171, 2015.

PENIDO, F. C. L.; PILÓ, F. B.; SANDES, S. H. de C.; NUNES, Á. C.; COLEN, G.; OLIVEIRA, E. de S.; ROSA, C. A.; LACERDA, I. C. A. Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 823-831, 2018.

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

PEREIRA, J. M.; AQUINO, A. C. M. de S.; OLIVEIRA, D. C. de; ROCHA, G.; FRANCISCO, A. de; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. Características das águas residuais da fermentação do amido de mandioca com base na degradação estrutural dos grânulos de amido. **Ciencia Rural**, v. 46, n. 4, p. 732-738, 2016.

PIZATO, S.; OGRODOWSKI, C. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Screening de variáveis para a produção de biomassa e ácido láctico utilizando planejamento Plackett-Burman. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 2, n. 3, p. 117-128, 2015.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

POLTHANEE, A.; SRISUTHAM, M. Growth, yield and water use of drip irrigated cassava planted in the late rainy season of Northeastern Thailand. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 52, n. 5, p. 554-559, 2018.

PONGTHARANGKUL, T.; DEMIRCI, A. Evaluation of Culture Medium for Nisin Production in a Repeated-Batch Biofilm Reactor. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 1, p. 217-224, 2006.

RIBEIRO, J. E. S.; MARTINI, A. M. da S.; MARTINI, M.; SORCE, C.; ANDREUCCI, A.; MELO, D. J. N. de; SILVA, F. L. H. da. *Rhodotorula glutinis* cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, n. 22, 2019.

ROSA, C. M.; FRANCO, B.; MONTVILLE, T. J.; CHIKINDAS, M. L. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, *Lactobacillus sake*, 2a. **Journal of Food Safety**, v. 22, n. 1, p. 39-54, 2002.

SABIA, C.; ANACARSO, I.; BERGONZINI, A.; GARGIULO, R.; SARTI, M.; CONDÒ, C.; MESSI, P.; NIDERHAUSERN, S. de; ISEPPI, R.; BONDI, M. Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolated from human vaginal secretions. **Anaerobe**, v. 26, p. 41-45, 2014.

SCHOENINGER, V.; COELHO, S. R. M.; CHRIST, D.; SAMPAIO, S. C. Processing parameter optimization for obtaining dry beans with reduced cooking time. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 49-57, 2014.

SHAH, N. P.; DAVE, R. I. Characteristics of Bacteriocin Like Inhibitory Substances Produced by *Lactobacillus acidophilus* (BDLA-1, 2409 and MOLA-2), *Lactobacillus fermentum* (5174) and *Lactobacillus plantarum* (2903). **Bioscience and Microflora**, v. 18, n. 2, p. 109-117, 1999.

SIFOUR, M.; IDOUI, T.; OULED-HADDAR, H.; NAMOUS, H. Production and characterization of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* F12 with inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. **The Online Journal of Science and Technology**, v. 2, p. 55-61, 2012. Disponível em: <www.tojsat.net>. Acesso em: 17 jan. 2020.

ŞİMŞEK, Ö.; CON, A. H.; AKKOÇ, N.; SARIS, P. E. J.; AKCELIK, M. Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered *Lactococcus lactis* strains. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 481-490, 2009.

SLOVER, C. M. *Lactobacillus*: a Review. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, n. 4, p. 23-27, 2008.

STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology**, n. 61, p. 33-49, 2017.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43, n. 4, p. 370-4, 2005a.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Production of Bacteriocin ST33LD, Produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, as Recorded in the Presence of Different Medium Components. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1585-1590, 2005b.

TOMARO-DUCHESNEAU, C.; SAHA, S.; MALHOTRA, M.; COUSSA-CHARLEY, M.; AL-SALAMI, H.; JONES, M.; LABBE, A.; PRAKASH, S. *Lactobacillus fermentum* NCIMB 5221 has a greater ferulic acid production compared to other ferulic acid esterase producing *Lactobacilli*. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 7, n. 1, p. 23-32, 2012.

VILVERT, R. M. **Obtenção de bacteriocina de bactérias lácticas em água residuária de indústria de fécula de mandioca**. 2019. 93f. Tese (Doutorado em engenharia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Unioeste - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2019.

VON MOLLENDORFF, J. W.; TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Optimization of Growth Medium for Production of Bacteriocins Produced By *Lactobacillus Plantarum* Jw3Bz and Jw6Bz, and *Lactobacillus Fermentum* Jw11Bz and Jw15Bz Isolated From Boza. **Trakia Journal of Sciences**, v. 7, n. 1, p. 22-33, 2009.

WANNUN, P.; PIWAT, S.; TEANPAISAN, R. Purification, Characterization, and Optimum Conditions of Fermencin SD11, a Bacteriocin Produced by Human Orally *Lactobacillus fermentum* SD11. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 4, p. 572-582, 2016.

WAYAH, S. B.; PHILIP, K. Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermenticin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, 2018.

YAN, T. R.; LEE, C. S. Characterization of a partially purified bacteriocin, Fermentcin B, from *Lactobacillus fermentum*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 8, p. 741-744, 1997.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; BAO, Y.; ZHANG, H.-P. Influence of pH, heat and enzymatic treatments on the activity of antibacterial substance in MRS and milk media produced by *Lactobacillus fermentum* F6. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 6, p. 911-920, 2010.

ZHAO, Y.; HONG, K.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; ZHAI, Q.; CHEN, W. *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 21-32, 2019.

ZHENG, J.; RUAN, L.; SUN, M.; GÄNZLE, M. A genomic view of lactobacilli and pediococci demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7233-7243, 2015.

ZHOU, X.; LI, Y. (Ed.) **Atlas of Oral Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2015.

ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE *Leuconostoc mesenteroides* EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

RESUMO: Com o aumento da demanda do mercado mundial por alimentos naturais e saudáveis, ampliaram-se as buscas por novas tecnologias e produtos que conservem os alimentos. A *Leuconostoc mesenteroides*, uma bactéria do ácido láctico com potencial para a produção de bacteriocinas, pode ser utilizada como um conservante natural nos alimentos e apresenta atividade antimicrobiana. A água residuária de fecularia pode ser utilizada como um substrato para a produção de bacteriocinas, sendo que o uso desse resíduo representa uma forma de valorização e minimização de impactos ambientais. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar condições de crescimento para a produção de bacteriocinas de *Leuconostoc mesenteroides* utilizando resíduos provenientes da agroindústria processadora de mandioca. Primeiramente, realizou-se o planejamento experimental Plackett & Burman (PB) para avaliar os efeitos das variáveis sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e Tween 80, com 15 ensaios, 36 h de incubação e agitação a 100 rpm. Foi realizada a cinética em 35 horas para escolher o melhor tempo de incubação e verificou-se que em 20 horas ocorreu a maior produção de bacteriocinas. Após análise de efeitos do PB, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para as variáveis significativas do PB (sacarose, extrato de levedura e Tween 80), durante 20 h, 30 °C e 100 rpm. A partir do DCCR foram avaliadas as superfícies de respostas, os efeitos significativos, sendo proposto, então, um modelo estatístico para a produção de bacteriocinas. Os resultados indicaram que a condição otimizada para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides* em água residuária de fecularia de mandioca foi definida pela suplementação de 8,03 g/L de sacarose, 18,20 g/L de extrato de levedura e 7,46 mL/L de Tween 80. Na condição otimizada, a produção de bacteriocinas foi de 3693,4 AU/mL.

Palavras-chave: *Leuconostoc mesenteroides*; bactérias do ácido láctico; resíduos agroindustriais.

6.1 Introdução

A deterioração de um produto alimentar pode ser definida como qualquer alteração que o torne não consumível do ponto de vista sensorial e de salubridade, uma vez que os produtos devem estar isentos de microrganismos potencialmente patogênicos (ÖZOGUL; HAMED, 2018). Os peptídeos antimicrobianos de bactérias do ácido láctico, como as bacteriocinas, podem ser utilizados na biopreservação dos alimentos (AHMAD et al., 2017; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018).

Bacteriocinas são pequenos peptídeos sintetizados ribossomicamente, capazes de inativar ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas, possuem resistência a altas temperaturas e pH baixo, o que favorece a sua aplicação na conservação de alimentos (CHIKINDAS et al., 2018; KUMARIYA et al., 2019). As bacteriocinas podem ser utilizadas em indústrias alimentícias, a fim de atenuar as perdas decorrentes da decomposição dos alimentos, bem como podem elevar o valor agregado do produto. Na literatura, os gêneros de bactérias do ácido láctico *Lactococcus* (homofermentativa) e *Leuconostoc* (heterofermentativa) são considerados grandes produtores de bacteriocinas, sendo uma das

espécies mais importantes destes a *Leuconostoc mesenteroides* (D'ANGELO et al., 2017; MADIGAN et al., 2010).

A bactérias do ácido láctico *Leuconostoc mesenteroides* é caracterizada como Gram-positiva, catalase negativa, morfologia na forma de cocóides ou cocobacilos, são fastidiosas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, mesófilas, com crescimento ótimo na faixa de 20 a 30 °C (PAULA et al., 2015; ZHANG et al., 2019). Essa espécie pode ser encontrada em diferentes ambientes, como, por exemplo, em vegetais, cereais, carnes, frutas e produtos lácteos (KIVANÇ; FUNDA, 2017; LIU, 2016; MASUDA et al., 2011; RANI; AGRAWAL, 2008; ALLAMEH et al., 2012).

Penido et al. (2018) identificaram a *Leuconostoc mesenteroides* em produto da mandioca. A mandioca é uma cultura alimentar muito importante em diversos países que estão inseridos na África, Ásia e América Latina, porém o seu processamento gera grandes quantidades de resíduos líquidos, que devem ser manejados adequadamente, podendo ser aplicados como meio de cultura em processos biotecnológicos.

Os resíduos da indústria processadora da fécula de mandioca possuem uma grande variedade de moléculas que podem ser convertidas em produtos de valor agregado, como na produção de etanol, ácido cítrico, álcool fenilético, ácido láctico, celulose, hemicelulose, proteína bruta, amido residual, fibras e lignina (MOSHI et al., 2015; SOUTO et al., 2016). A água residuária, resíduo líquido, possui alto valor nutricional, podendo ser utilizado como substrato em processos biológicos, além de poder fornecer microrganismos de interesse biotecnológico, devido à rica biota autóctone presente (OLIVEIRA; REIS; NOZAKI, 2001). Um exemplo disso é a detecção da bacteriocina nisina no efluente bruto de indústria de processamento de mandioca (GOMES et al., 2016).

Devido às características da espécie *Leuconostoc mesenteroides* e da água residuária da indústria de fécula de mandioca, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de bacteriocinas por *L. mesenteroides* em água residuária de fecularia em função da suplementação do meio de fermentação. Para tanto, foram aplicados dois delineamentos experimentais: Plackett-Burman (PB – para selecionar fatores que influenciam na produção de bacteriocina) e o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR – para otimizar a produção de bacteriocinas).

6.2 Material e métodos

6.2.1 Inóculo de *Leuconostoc mesenteroides*

O inóculo foi preparado a partir de uma cultura estoque de *Leuconostoc mesenteroides* reportado como produtor de bacteriocina, isolada da água residuária da produção de farinha de mandioca por Vilvert (2019) e conservada em caldo MRS (g/L) da marca Sigma-Aldrich® (Referência 63016-500G-F), contendo 20% (v/v) de glicerol e congelada a -4 °C. Para a ativação do inóculo foram utilizados 10% da cultura estoque (v/v) e 90% do caldo MRS (g/L), sendo adicionado 1 mL de vaselina (mL/L) para assegurar condições anaeróbias. O inóculo foi incubado em agitador rotacional (shaker) a 100 rpm, a 30 °C, por 16 horas ou até a obtenção de densidade óptica (OD) de 1 em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm.

6.2.2 Meio de cultivo – água residuária de indústria de fécula de mandioca

A água residuária da fécula de mandioca foi utilizada como meio de cultivo para a produção de bacteriocinas, sendo coletada de uma fecularia da região do Oeste do Paraná, Brasil, homogeneizada, filtrada e realizada a caracterização físico-química por meio de parâmetros pré-estabelecidos (Tabela 1). Os métodos que foram utilizados para a realização das análises são descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (EATON; CLESCERI; GREENBERG, 2005), com exceção dos açúcares totais, que foram determinados segundo Dubois et al. (1956).

Tabela 1 Parâmetros físico-químicos analisados para a caracterização da água residuária da fécula de mandioca

Parâmetros	Unidades	Água residuária
pH	-	4,02
DQO bruta	mg L ⁻¹	7741,13
DQO filtrada	mg L ⁻¹	4172,70
Carbono orgânico total	g L ⁻¹	4115,00
Nitrogênio amoniacal	mg L ⁻¹	14,98
Nitrogênio total	mg L ⁻¹	246,40
Açúcareses totais	mg L ⁻¹	5007,19
Ácido láctico	mg L ⁻¹	3830,00
Ácido acético	mg L ⁻¹	1053,94
Sólidos totais	mg L ⁻¹	6817,33
Sólidos suspensos totais	mg L ⁻¹	1250,00

Legenda: DQO: Demanda química de oxigênio.

6.2.3 Caracterização morfológica e bioquímica da cepa *Leuconostoc mesenteroides*

A caracterização morfológica e bioquímica da cultura estoque foi realizada através da coloração de Gram e produção de catalase. A técnica de coloração de Gram foi realizada através do tratamento de células 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. Para o teste de catalase, foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio na superfície das culturas cultivadas em ágar M17: o borbulhamento imediato da cultura indica catalase positiva e, na ausência, catalase negativa.

6.2.4 Delineamento experimental para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

6.2.4.1 Preparo dos tratamentos para o Plackett & Burman (PB) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para *Leuconostoc mesenteroides*

Os tratamentos do PB e DCCR foram realizados a partir de fermentações em frascos de 120 mL: cada frasco foi composto por 45 mL de água residuária da fécula de mandioca enriquecida com os nutrientes apresentados nas Tabelas 2 e 3, de acordo o PB e o DCCR. Inicialmente, foi ajustado o pH para 6 com NaOH 0,2 mol/L para todos os tratamentos. Após, os frascos foram autoclavados a 121 atm, por 15 minutos e, após o resfriamento do material, foi adicionado 5 mL do inóculo (cerca de 10% v/v, descrito no item 6.2.1) para então serem incubados a 35 °C, a 100 rpm por 36 horas no PB e nas mesmas condições por 20 horas no DCCR. O esquema do experimento pode ser visualizado na Figura 1.

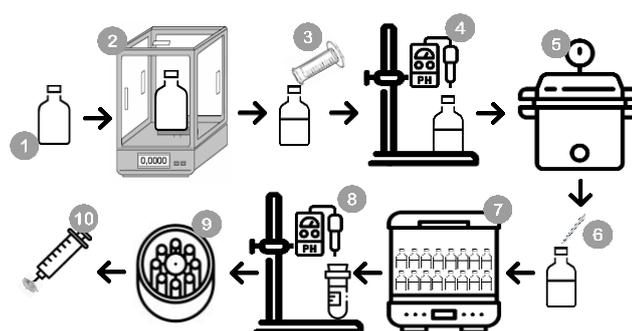


Figura 1 Etapas dos processos envolvidos na produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*.

Legenda: 15 frascos (1), pesagem dos nutrientes de acordo com as variáveis do planejamento experimental e transferência para os frascos (2), adição da água residuária (3), ajuste do pH (4), autoclavação (5), adição do inóculo (6), incubação em agitador rotacional shaker (7). Ao término do período de incubação foi realizado o ajuste do pH para 2,5 (8), a centrifugação (9). O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de uma seringa com filtro 0,20 µm (10).

Fonte: Autoria própria (2020).

Após o período de fermentação o pH foi corrigido para 2,5 com HCL 0,2 mol/L para promover a excreção total das bacteriocinas da célula para o meio extracelular. O meio acidificado foi centrifugado a 3.200 rpm por 20 min, onde o sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro de 0,20 μ m. No sobrenadante foram realizadas análises físico-químicas dos seguintes parâmetros: DQO, açúcares totais, ácido láctico, ácido acético e bacteriocinas. O precipitado da centrifugação foi utilizado para a quantificação da biomassa, sendo essa expressa como sólidos suspensos totais (SST) (JOZALA, 2005).

6.2.4.2 Plackett & Burman (PB) para *Leuconostoc mesenteroides*

O delineamento experimental Plackett & Burman (PB) é um de delineamento que permite selecionar fatores significativos que exercem influência em determinada produção, sendo adequado por estudar de forma eficiente e econômica o efeito dos fatores (KARLAPUDI et al., 2018). Neste trabalho, foi aplicado o PB para avaliar a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*, sendo selecionadas cinco variáveis independentes: sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e polissorbatato Tween 80.

As variáveis foram selecionadas com base na revisão de literatura, identificadas como fatores que exercem influência na produção de bacteriocinas (AMIALI; LACROIX; SIMARD, 1998; CABO et al., 2001; CHANDRAPATI; O'SULLIVAN, 1998; CHEIGH et al., 2002; DABA et al., 1993; GUERRA; RUA; PASTRANA, 2001; LIU et al., 2004; LOSTEINKIT et al., 2001; PARENTE; RICCIARDI, 1999; PONGTHARANGKUL; DEMIRCI, 2006; ŞİMŞEK et al., 2009). No PB, foi aplicado um delineamento experimental composto por 15 ensaios, sendo: 12 ensaios nos níveis -1 e +1 e três repetições do ponto central (Tabela 2). Os ensaios foram conduzidos conforme descrito no item 6.2.4.1.

Tabela 2 Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental fatorial Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Sacarose (g/L)	0	10	20
Extrato de levedura (g/L)	0	7,5	15
Fosfato de potássio (g/L)	0	0,57	1,14
Sulfato de magnésio (g/L)	0	0,57	1,14
Tween 80 (mL/L)	0	2	4

Na Tabela 3 são apresentadas as condições do modelo experimental PB, com 12 ensaios e 3 repetições no ponto central.

Tabela 3 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental Plackett-Burman para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

Ensaio	Sacarose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Fosfato de potássio (g/L)	Sulfato de magnésio (g/L)	Tween 80 (mL/L)
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

6.2.4.3 Obtenção da cinética de produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

Identificado o tratamento com maior influência na produção de bacteriocinas no delineamento experimental PB, foi realizada a cinética para verificar o melhor tempo de fermentação durante 35 horas, com amostras retiradas a cada 5 h, utilizando a água residuária da fécula de mandioca como meio cultivo. Definido o melhor tempo, foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimizar a produção de bacteriocinas.

6.2.4.4 Delineamento Composto Central e Rotacional (DCCR) para *Leuconostoc mesenteroides*

Identificadas as variáveis com maior influência na produção de bacteriocinas e o melhor tempo de fermentação, foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimizar a produção de bacteriocinas. Neste, foi aplicado um planejamento fatorial 2^3 ($2 \times 2 \times 2$) composto por 17 ensaios, sendo: oito ensaios nos níveis -1 e +1, seis ensaios na parte axial $-\alpha$ e $+\alpha$ e três repetições do ponto central. As variáveis selecionadas foram sacarose, extrato de levedura e Tween 80 (Tabela 4). Para a realização do experimento, os ensaios foram realizados conforme descrito no item 6.2.4.1.

Tabela 4 Variáveis independentes e níveis do Delineamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

Variável	Níveis				
	-α	-1	0	+1	+α
Sacarose (g/L ⁻¹)	0	5,05	12,50	19,94	25,00
Extrato de levedura (g/L ⁻¹)	0	4,04	10,00	15,95	20,00
Tween 80 (mL/L ⁻¹)	2,00	3,21	5,00	6,78	8,00

Na Tabela 5 são apresentadas as condições experimentais do DCCR considerando os 17 ensaios.

Tabela 5 Condições experimentais codificadas do planejamento experimental composto central rotacional (DCCR) para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

Ensaio	Sacarose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Tween 80 (mL/L)
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	-α	0	0
10	+α	0	0
11	0	-α	0
12	0	+α	0
13	0	0	-α
14	0	0	+α
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 2ª ordem e é descrito pela Equação 1.

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

Em que:

Y - resposta predita de produção de bacteriocina (AU/ml);

β_0 - valor constante do intercepto;

β_i - coeficiente lineares;

x_i - os parâmetros variáveis;

β_{ii} - coeficiente quadrático de x_i ;

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

6.2.4.5 Otimização e validação experimental para *Leuconostoc mesenteroides*

Inicialmente, com o auxílio do software Action Stat®, foi verificado se os resultados obtidos no PB e no DCCR possuíam normalidade. Caso não tivessem, os dados seriam transformados pela técnica box-cox no software Statística®. Na sequência, com o auxílio do software Statística®, foram determinados os efeitos estimados e realizada a análise de variância (ANOVA), a fim de determinar a equação do modelo e gerar os 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.

Foram geradas superfícies de respostas do modelo-predito para avaliar as relações interativas entre as variáveis significativas, com nível de significância de 10%. Para estimar as melhores respostas de produção de bacteriocinas, foi utilizada a função desirability de Derringer no Statística®. Segundo Derringer e Suich (1980), a função desirability tem como objetivo encontrar as melhores condições de operação que considerem os critérios para todas as respostas envolvidas, sendo os valores dessa função restritos ao intervalo [0,1], onde 0 é um valor inaceitável e 1 é o valor mais desejável.

6.2.5 Métodos analíticos para *Leuconostoc mesenteroides*

Para todos os ensaios, utilizou-se o sobrenadante dos tratamentos para determinação dos parâmetros. O parâmetro pH foi medido a partir do pHmetro de bancada Tec 3MP da marca Tecnal®. A demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST) – Massa seca, foram determinados pelos métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (EATON.; CLESCERI; GREENBERG, 2005). As medidas das concentrações dos açúcares totais foram quantificadas de acordo com Dubois et al. (1956). A análise do ácido láctico foram realizadas por cromatografia de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia descrita por Penteado et al. (2013).

6.2.6 Determinação da atividade de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

A determinação da atividade de bacteriocinas foi realizada pelo método de difusão em ágar descrito por Lewus e Montville (1991). O ágar escolhido para verificar o crescimento das bacteriocinas foi o TSA (Ágar triptona de soja) suplementado com sangue de carneiro em 5% v/v. O *Lactobacillus sakei* (*L. sakei*) foi utilizado como microrganismo indicador da atividade de bacteriocinas, de acordo com Bromberg e colaboradores (2006), na avaliação da produção da bacteriocina nisina.

O cultivo do *L.sakei* foi realizado adicionando 1 mL das células em 9 mL de caldo MRS (100 rpm, 30 °C, 24 horas) e, na sequência, foi feita a leitura da densidade óptica (DO) a 660 nm, indicando um valor de 0,4. Uma fração de 100 µl da cultura do *L.sakei* foi espalhada na placa de Petri com auxílio da alça de Drigalski, contendo o meio TSA suplementado com sangue de carneiro já solidificado. Então, foram inseridos orifícios (poços) de aproximadamente 3 mm de diâmetro na superfície do ágar com o auxílio de um perfurador de metal estéril; alíquotas de 20 µl do sobrenadante das amostras fermentadas foram colocadas em cada orifício. Após os procedimentos descritos, as placas foram incubadas na jarra de anaerobiose a 35 °C por 24 horas. Ao término do período de incubação, foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos formados ao redor dos poços com o auxílio de um paquímetro digital.

Para a determinação da produção de bacteriocina foi preparada uma curva padrão com uma solução comercial contendo 2,5% nisina (Sigma Aldrich), correspondendo a 10⁶ AU/g. A curva 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. O diâmetro do halo formado, após a inibição do crescimento celular pela bacteriocina, foi medido utilizando um paquímetro digital em quatro pontos. A medida média dos halos está relacionada à atividade da bacteriocina, sendo expressa em unidades arbitrárias (arbitrary units – AU). A relação dos diâmetros do halo de inibição com a concentração de bacteriocina gerou uma equação da reta, descrita pela Equação 2.

$$PB = \log_{10}^{((0,1632*x)+0,6135)} \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que:

PB - produção de bacteriocina (AU/mL);

x - medida do halo de inibição (mm).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Caracterização de *Leuconostoc mesenteroides* isolada dos resíduos do processamento de mandioca

Leuconostoc mesenteroides é uma bactéria do ácido láctico, Gram-positiva, possui forma de cocos (Fig.2a) (FRANCO-CENDEJAS et al., 2017); em meio MRS possui cor branca, leitosa e circular (Fig2.b); não possui sensibilidade quando testada ao antibiótico vancomicina (PAULA et al., 2015; STILES, 1994); e possui catalase negativa (LEE; KIM,

2019). A cepa de *Leuconostoc mesenteroides* utilizada neste trabalho foi isolada e identificada por Vilvert (2019) a partir da água residuária da farinha de mandioca e possui produção bacteriocina.

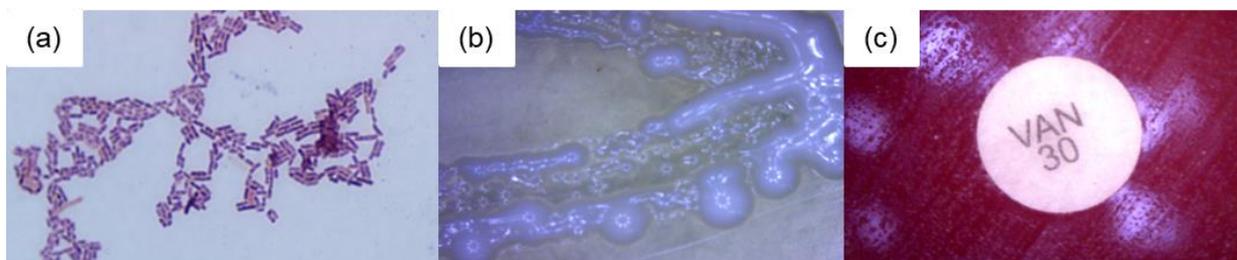


Figura 2 Caracterização morfológica da *Leuconostoc mesenteroides*.

Legenda: a) bactéria Gram-positiva; b) cultura com forma branca em meio ágar MRS; c) teste de antagonismo em relação à vancomicina sem formação do halo de inibição do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides*.

Fonte: Autoria própria (2020).

A presença de *Leuconostoc mesenteroides* em resíduos dos produtos da mandioca foi relatada por diversos autores (AHAOTU et al., 2017; AMPE; SIRVENT; ZAKHIA, 2001; ANYOGU et al., 2014; COULIN et al., 2006; DJENI et al., 2015; EDWARD et al., 2011; KOSTINEK et al., 2008; LEI; AMOA-AWUA; BRIMER, 1999; OGUNTOYINBO; DODD, 2010; OMAR et al., 2000; RAMOS et al., 2015). Até o presente momento não há muitos estudos que relatem a produção bacteriocina por *Leuconostoc mesenteroides* a partir da água residuária da fécula de mandioca, bem como o uso desse resíduo como um substrato para esse fim.

6.3.2 Produção de bacteriocinas

A produção de bacteriocinas requer meios complexos para o crescimento, como Man Rogosa Sharpe (MRS), M17, Brain Heart Infusion (BHI), Caldo Soja Trypticaseína (TSB) e Extrato de Glicose Triptona (TGE) (ABBASILIASI et al., 2017). A escolha do meio deve ser baseada de acordo com as características particulares do microorganismo, do produto e do habitat a que pertence (BRUNO, 2011). Porém, o alto custo para a obtenção desses meios pode inviabilizar a produção de microrganismos em larga escala. Dessa forma, torna-se interessante o uso de resíduos agroindustriais, como a água residuária da fécula de mandioca como meio de cultivo para produção de bacteriocinas.

A água residuária da fécula de mandioca possui grande potencial biotecnológico, tendo altas concentrações de nutrientes em sua composição, como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio (BEZERRA et al., 2017). O uso desse resíduo possui diversas

aplicações que agregam valor econômico e permitem diminuir impactos gerados por ele no meio ambiente. Na literatura, muitos autores utilizam a água residuária da fécula na produção de hidrogênio, fertilização, irrigação, processos biotecnológicos e outros (CARVALHO et al., 2017; GOMES et al., 2016; OKUDOH et al., 2014; POLTHANEE; SRISUTHAM, 2018; RIBEIRO et al., 2019; TORRES et al., 2017).

6.3.3 Otimização e validação experimental

6.3.3.1 Plackett & Burman (PB) para *Leuconostoc mesenteroides*

O delineamento experimental Plackett-Burman (PB) auxiliou na escolha dos fatores significativos para a produção de bacteriocinas contemplando as variáveis sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e Tween 80 (Tabela 6). Os valores para a produção bacteriocina (AU/ml) foram transformados no software Statistica® pelo método box-cox, para atender à normalidade dos dados.

Tabela 6 Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman com os valores reais e codificados e suas respostas para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

Ensaio	Sacarose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Fosfato de potássio (g/L)	Sulfato de magnésio (g/L)	Tween 80 (ml/L)	Produção de bacteriocina (AU/mL)*
1	20 (1)	0 (-1)	1,14 (1)	0 (-1)	0 (-1)	317,88
2	20 (1)	15 (1)	0 (-1)	1,14 (1)	0 (-1)	200,36
3	0 (-1)	15 (1)	1,14 (1)	0 (-1)	4 (1)	300,65
4	20 (1)	0 (-1)	1,14 (1)	1,14 (1)	0 (-1)	193,69
5	20 (1)	15 (1)	0 (-1)	1,14 (1)	4 (1)	648,34
6	20 (1)	15 (1)	1,14 (1)	0 (-1)	4 (1)	857,80
7	0 (-1)	15(1)	1,14 (1)	1,14 (1)	0 (-1)	150,86
8	0 (-1)	0 (-1)	1,14 (1)	1,14 (1)	4 (1)	346,15
9	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1,14 (1)	4 (1)	1990,47
10	20 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	4 (1)	1185,06
11	0 (-1)	15 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	202,63
12	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	140,21
13	10 (0)	7,5 (0)	0,57 (0)	0,57 (0)	2 (0)	329,02
14	10 (0)	7,5 (0)	0,57 (0)	0,57 (0)	2 (0)	341,62
15	10 (0)	7,5 (0)	0,57 (0)	0,57 (0)	2 (0)	342,91

Legenda: Valores reais, sem transformação*.

No gráfico de efeitos (Figura 3) é possível verificar visualmente quais variáveis exercem mais influência com 10% de significância, considerando os valores transformados que atendem à normalidade dos dados.

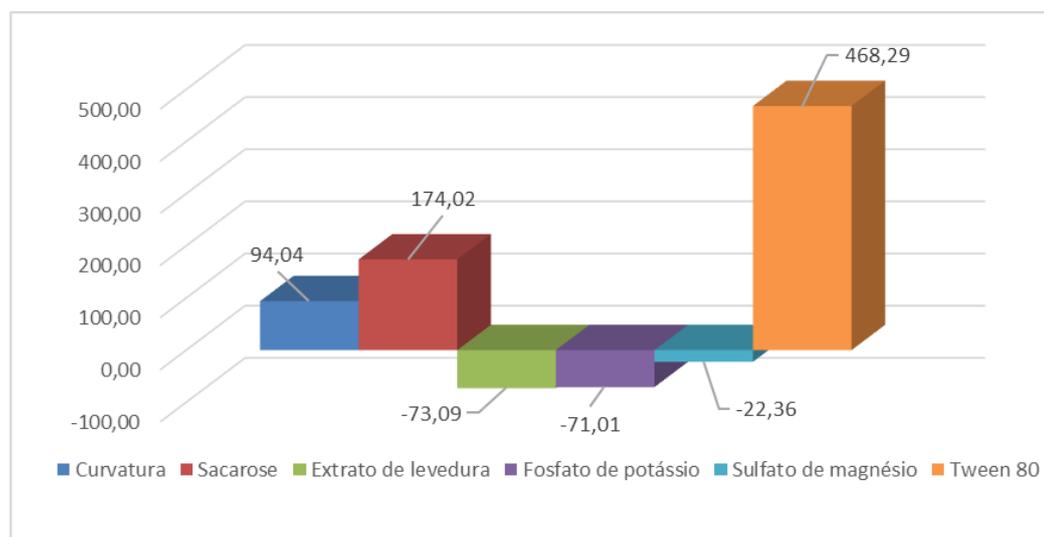


Figura 3 Gráfico de efeitos das variáveis independentes para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*.

Analisando o delineamento experimental PB (Tabela 6) verifica-se que a menor produção de bacteriocinas foi no tratamento 12 com 140,21 AU/ml. Esse resultado confirmou a expectativa para esse nível, tendo em vista que não foi realizada a suplementação da água residuária com nenhum dos fatores. Porém, a partir desse resultado infere-se que, apesar da produção baixa, a água residuária da fécula de mandioca pode ser considerada como um substrato para a produção de bacteriocinas, uma vez que houve produção.

A maior produção de bacteriocinas foi no tratamento 9 com 1990,47 AU/mL: nesse nível foram adicionados fosfato de potássio e Tween 80. A partir dos resultados, verificou-se que em todos os tratamentos que utilizaram Tween 80 a produção de bacteriocinas aumentou, sendo este o fator mais significativo, como pode ser visto na Figura 3.

Nos ensaios do ponto central (14, 15 e 16), as produções de bacteriocinas foram de 329,02, 341,62 e 342,91 AU/ml, respectivamente, não havendo diferença estatística entre os tratamentos. Valores próximos nos pontos centrais indicam que os erros experimentais foram baixos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). A produção bacteriocina nesses pontos pode ter sido influenciada pela concentração de Tween 80, que foi inferior à utilizada no tratamento 9 (4 mL/L), que apresentou a maior produção de bacteriocinas.

O sulfato de magnésio e o fosfato de potássio exerceram influência menor na produção de bacteriocinas, como pode ser visto na Figura 3. Inicialmente, o sulfato de magnésio foi escolhido no PB por ser uma fonte de metal; já o fosfato de potássio foi adicionado por sua atividade tamponante para retardar a queda do pH. No estudo realizado

por Furtado e colaboradores (2014), avaliando o uso de sulfato de magnésio e fosfato de potássio, os resultados indicaram que esses dois componentes são importantes para a produção da bacteriocina nisina por *Lactococcus lactis*, quando utilizados em quantidades adequadas.

Para a realização do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e, conseqüentemente, a otimização da produção de bacteriocinas, verificou-se que os fatores que mais exerceram influência no PB foram o Tween 80, a sacarose e o extrato de levedura, sendo estes os selecionados para o DCCR. O valor da curvatura (Figura 3) teve um efeito significativo e positivo, indicando que é necessário aumentar moderadamente a concentração das variáveis estudadas.

6.3.3.2 Cinética da produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

Com o intuito de aumentar a produção de bacteriocinas a partir de *Lactobacillus fermentum*, foi realizado um experimento de cinética para identificar o melhor tempo de fermentação, durante 35 horas, com amostras retiradas a cada 5 h, contabilizando 8 pontos amostrais. Nestas amostras foram determinados a produção de bacteriocinas, o ácido láctico e a massa seca (Figura 4).

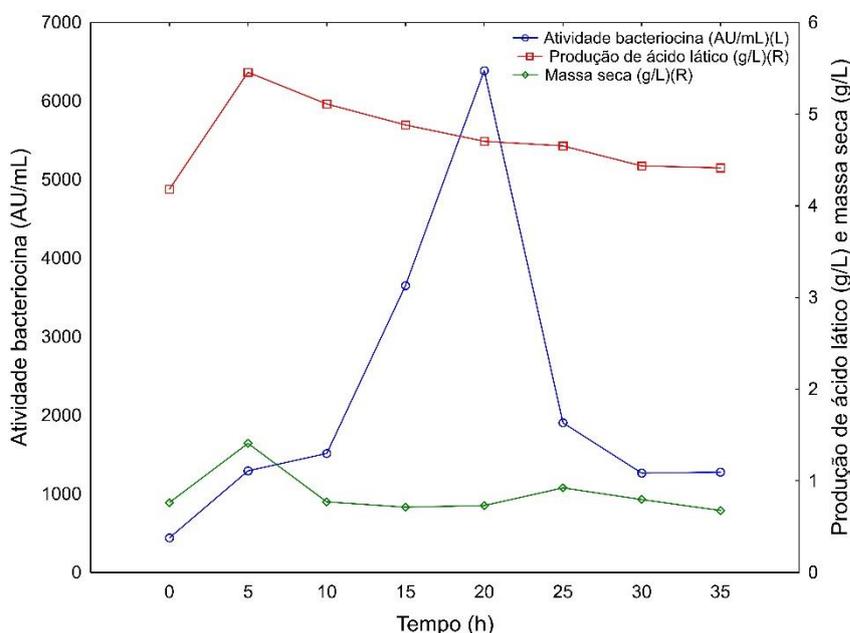


Figura 4 Cinética da atividade de bacteriocina por *Leuconostoc mesenteroides*, produção do ácido láctico e massa seca em função do tempo.

A maior produção de bacteriocinas foi em 20 horas de fermentação, com valor de 6386,81 AU/ml. Em relação à produção de ácido láctico e massa seca (biomassa), foi possível verificar que apresentaram comportamentos semelhantes: no período de aumento

da biomassa também se observou aumento da produção de ácido láctico. Já a produção de bacteriocinas exibiu comportamento diferente, com pico num período em que a produção de biomassa estava relativamente estável e do ácido láctico decrescente.

Todorov e Dicks (2005) avaliaram o crescimento da produção da bacteriocina ST33LD produzida pela *Leuconostoc mesenteroides* e identificaram que a maior produção foi de 6400 AU/ml em 20 horas de incubação em caldo MRS, com pH inicial de 6,0 e o final entre 3,65 e 3,86, semelhante à produção bacteriocina obtida nesse trabalho. No entanto, o diferencial deste trabalho em relação a esses autores foi o meio de cultivo agroindustrial, comprovando que a água residuária da fécula de mandioca possui potencial para uso na produção de bacteriocinas.

Paula e colaboradores (2014) avaliaram a cinética de uma cepa de *Leuconostoc mesenteroides* com produção bacteriocina por 48 horas a 25 °C e verificaram que a partir de 3 horas o modo de ação antimicrobiano já era produzido por essa bactéria; em 15 horas atingia o máximo de produção de produção bacteriocina em torno de 3000-3500 AU/mL; e em 46 horas diminuía a produção. Inicialmente, o inóculo utilizado por esses autores contendo a *Leuconostoc mesenteroides* foi incubado por 18 horas, 30 °C no MRS.

6.3.3.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

No Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foram utilizadas as variáveis selecionadas do PB (sacarose, extrato de levedura e Tween 80). A matriz do planejamento experimental do DCCR referente às variáveis dependentes e independentes é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 Matriz do planejamento experimental DCCR com os valores reais e codificados das variáveis independentes e os valores obtidos para produção bacteriocina por *Leuconostoc mesenteroides*, eficiência de remoção de DQO, eficiência de remoção de açúcares totais, ácido lático, ácido acético, massa seca e pH, após 20 horas de fermentação

Níveis	Sacarose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Tween 80 (ml/L)	Produção bacteriocina (AU/ml)	Eficiência de remoção de açúcares (%)	Eficiência de remoção de DQO (%)	Massa seca (g/L)	Produção de ácido lático (g/L)	Produção de ácido acético (g/L)	pH
1	5,06 (-1)	4,05 (-1)	3,21 (-1)	826,17	62,44	41,96	8,42	13,54	1,00	3,33
2	19,94 (+1)	4,05 (-1)	3,21 (-1)	912,67	13,59	5,00	6,57	12,42	0,93	3,31
3	5,06 (-1)	15,95 (+1)	3,21 (-1)	586,89	61,59	34,08	6,90	14,54	1,20	3,45
4	19,94 (+1)	15,95 (+1)	3,21 (-1)	343,55	7,49	18,98	6,75	14,33	1,16	3,44
5	5,06 (-1)	4,05 (-1)	6,79 (+1)	2392,90	48,99	43,70	2,42	12,38	0,95	3,29
6	19,94 (+1)	4,05 (-1)	6,79 (+1)	2379,45	19,57	12,13	11,17	12,96	0,97	3,31
7	5,06 (-1)	15,95 (+1)	6,79 (+1)	3693,35	57,40	33,04	8,61	13,36	1,11	3,47
8	19,94 (+1)	15,95 (+1)	6,79 (+1)	1997,97	3,37	15,77	8,83	14,29	1,14	3,46
9	0,00 (- α)	10,00 (0)	5,00 (0)	1017,76	18,96	10,95	4,96	8,74	1,19	3,68
10	25,00 (+ α)	10,00 (0)	5,00 (0)	1818,81	0,42	49,52	10,58	13,51	1,06	3,41
11	12,50 (0)	0,00 (- α)	5,00 (0)	1712,68	10,79	30,83	5,49	10,28	0,81	3,34
12	12,50 (0)	20,00 (+ α)	5,00 (0)	2357,20	24,53	42,60	8,09	17,35	1,64	3,53
13	12,50 (0)	10,00 (0)	2,00 (- α)	283,64	37,94	45,78	7,18	13,89	1,08	3,40
14	12,50 (0)	10,00 (0)	8,00 (+ α)	1960,78	34,81	47,02	6,67	14,70	1,14	3,39
15	12,50 (0)	10,00 (0)	5,00 (0)	1479,20	57,57	61,62	5,10	13,04	1,02	3,40
16	12,50 (0)	10,00 (0)	5,00 (0)	1495,97	49,31	36,60	4,77	13,23	1,02	3,40
17	12,50 (0)	10,00 (0)	5,00 (0)	1457,14	40,09	48,35	5,43	12,33	1,00	3,39

Legenda: DQO (Demanda química de oxigênio).

Na Figura 5 são apresentados os gráficos de Pareto que demonstram os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis respostas do DCCR.

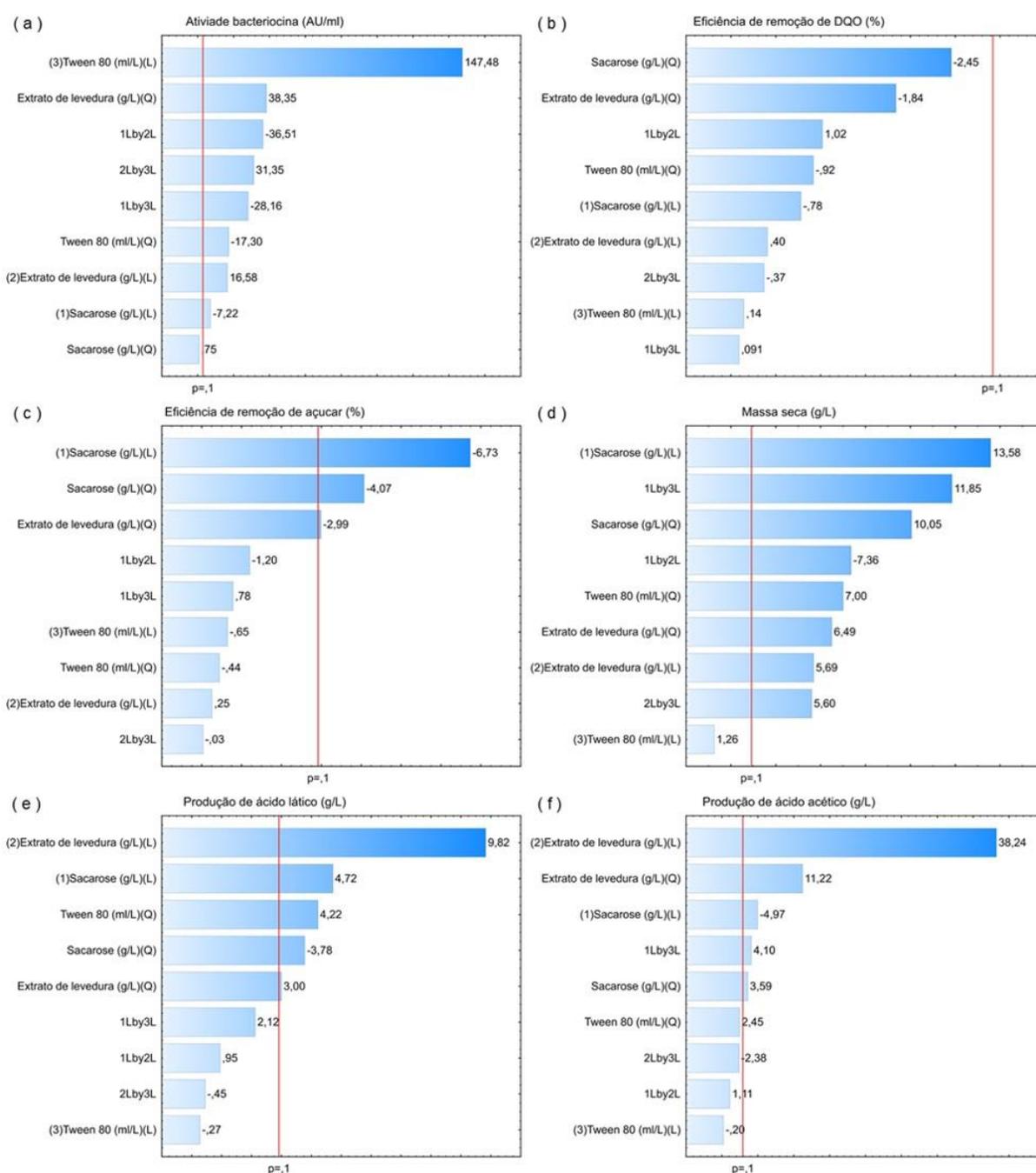


Figura 5 Gráficos de Pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Delineamento Central Composto Rotacional para cada variável resposta.

Legenda: a) produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*; b) eficiência de remoção de DQO; c) eficiência de remoção de açúcares; d) massa seca; e) produção de ácido láctico; e f) produção de ácido acético.

A produção de bacteriocinas variou significativamente: a menor produção foi observada no tratamento 12 (283,64 AU/ml), enquanto a maior foi no tratamento 7 (3693,35

AU/ml). Dessa forma, verifica-se que no tratamento 12 a baixa concentração de Tween 80 (2,00 mL/L) (- α) proporcionou baixa atividade de bacteriocina, ao contrário do tratamento 7, que, com concentração de 6,79 g/L (+1) de Tween 80 aliada às fontes de nitrogênio e carbono, gerou a maior produção bacteriocina.

Nota-se que o Tween 80 se mostrou o fator principal para a produção de bacteriocinas, seguido pelo extrato de levedura e das interações entre os substratos (Figura 5a). O desempenho do Tween 80 pode ser definido por sua característica surfactante, que acelera o crescimento das células e interfere na permeabilidade da membrana, acelerando a difusão de bacteriocinas (MARTINEZ et al., 2013; ROSA et al., 2002).

A adição do Tween 80 não apresentou efeito significativo no trabalho de Xiraphi et al. (2008), quando adicionaram 0,1 % (v/v) na produção da bacteriocina E131 por *Leuconostoc mesenteroides*. Já para Todorov e Dicks (2005), avaliando a atividade da bacteriocina ST33LD da *Leuconostoc mesenteroides* pelo efeito do Tween 80, verificaram que houve aumento de 50% na produção. Na Tabela 8 são apresentados diversos estudos em que a adição de Tween 80 apresentou efeito significativo positivo sobre a produção de bacteriocinas por diferentes bactérias do ácido lático.

Tabela 8 Efeito do Tween 80 na produção de bacteriocinas por bactérias lácticas

BAL	Bacteriocina	Produção bacteriocina (AU/ml)		Concentração de Tween 80	Referência
		sem adição de Tween 80	com adição de Tween 80		
<i>E. faecium</i> NKR-5-3	Bacteriocin NKR-5-3	800	3200	0,1% (v/v)	(WILAI PUN et al., 2002)
<i>L. lactis</i> L.	Nisin	~25000	~5100	5 (g/L)	(LIU et al., 2005)
<i>L. rhamnosus</i> ST461BZ & ST462BZ	Bacteriocins ST461BZ & ST462BZ	NM*	Aumento maior que 50%	NM	(TODOROV; DICKS, 2006)
<i>L. casei</i> CRL 705	Lactocin 705	0	2133	0,5 /1,0% (v/v)	(VIGNOLO et al., 1995) (VON
<i>L. plantarum</i> JW6BZ	Bacteriocin JW3BZ	3200	51200	0,15/ 0,20 (ml/L)	MOLLENDORFF; TODOROV; DICKS, 2009) (VON
<i>L. fermentum</i> JW15BZ	Bacteriocin JW15BZ	3200	25600	0,15/ 0,20 (ml/L)	MOLLENDORFF; TODOROV; DICKS, 2009) (TODOROV;
<i>L. sakei</i> ST22CH	Bacteriocin ST22CH	1600	6400	5 (g/L)	OLIVEIRA; VAZ-VELHO, 2012)

Legenda: NM (não mencionado), *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus sakei*.

O extrato de levedura adicionado ao meio de cultivo serve como uma fonte de nitrogênio orgânico, muito utilizado para o crescimento celular microbiano, que possui solubilidade em água para as células de levedura que são formadas por aminoácidos, peptídeos, carboidratos e sais (ABBASILIASI et al., 2017). Os aminoácidos essenciais do extrato de levedura são um dos fatores que impulsionam o aumento da produção da bacteriocina (WAYAH; PHILIP, 2018).

A sacarose não foi uma variável significativa no intervalo de confiança de 90% (Figura 5a). O mesmo foi observado por Mataragas et al. (2004), que avaliaram o efeito da fonte de carbono glicose para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides* L124 nas concentrações de 30, 45 e 60 g/L e verificaram que não houve diferença estatística significativa a 5% na produção bacteriocina, tendo uma produção máxima de 2560 AU/ml para ambos os tratamentos. Os autores também avaliaram a influência do extrato de levedura com 10 e 15 g/L em conjunto com a glicose e verificaram que não houve diferença estatística para as duas concentrações, tanto na produção de bacteriocina, quanto na produção de biomassa.

Para a eficiência de remoção de DQO, os efeitos de todos os fatores foram significativos a 10%; porém, a influência da sacarose e do extrato de levedura foram maiores, uma vez que essas variáveis correspondem a fontes de carbono e nitrogênio orgânico, respectivamente (Figura 5b). A influência dessas variáveis pode ser explicada pela própria função da DQO, em que os valores desse parâmetro refletem a quantidade total de componentes oxidáveis como fontes de carbono e compostos orgânicos (AQUINO; SILVA; CHERNICHARO, 2006). É importante ressaltar que para o tratamento da água residuária da fécula de mandioca, eficiências altas de remoção de DQO são necessárias para o descarte correto no meio ambiente.

A eficiência da remoção de açúcares está relacionada com o consumo da sacarose (fonte de Carbono) (Figura 5c), podendo esta ser convertida em ácidos orgânicos e metabólitos pela via de fermentação heterofermentativa do *L. mesenteroides* (CÁRDENAS et al., 2015), relacionada ao aumento da produção de bacteriocinas (PAPAGIANNI; AVRAMIDIS; FILIOUSIS, 2007). No presente estudo, verifica-se que a baixa eficiência de remoção de açúcares está relacionada com o excesso de sacarose no meio, como observado nos ensaios com níveis +1 e + α de sacarose (Tabela 7), em que o carbono não foi totalmente convertido.

Na fermentação da *Leuconostoc mesenteroides*, ocorre a formação de ácidos orgânicos, como láctico e acético (Figuras 5e e 5f). Portanto, há necessidade de uma fonte de carbono, como a sacarose, para ser consumida e convertida nesses ácidos (ZHAO et al.,

2019). Para a formação do ácido láctico, as variáveis extrato de levedura e sacarose foram as mais significativas a 10%. No tratamento em que não foi adicionada sacarose e com baixa concentração de extrato de levedura (ensaio 9), a produção do ácido foi menor. A variável biomassa mostrou-se relacionada diretamente com a produção de ácido láctico, ou seja, no geral a maior produção de uma variável correspondeu à maior produção da outra.

O ácido acético atua sobre as células de bactérias Gram-positivas, estimulando a membrana celular, fazendo com que as células interajam com o ambiente extracelular. Dessa forma, as células começam a se adaptar a ambientes adversos e, conseqüentemente, produzem maiores quantidades de bacteriocinas para inativar bactérias concorrentes ou sinalizar a população (GE; KANG; PING, 2019). Os tratamentos com as maiores concentrações do ácido acético também foram os que apresentaram as maiores produções de bacteriocinas (ensaios 7, 8, 9, 12 e 14).

O pH e a temperatura podem exercer influência no crescimento de bactérias do ácido láctico (BAL) e na produção de bacteriocinas. A temperatura ideal para crescimento de BAL é 30 °C, e o pH entre 6,0 e 6,5 (MATARAGAS et al., 2004; ÖZEL et al., 2018). Neste trabalho, a temperatura de incubação foi de 30 °C e o pH inicial foi de 6,0 (Tabela 21), demonstrando que esses valores escolhidos são indicados para a produção de bacteriocinas.

Os resultados das análises dos efeitos da produção de bacteriocinas utilizando sacarose, extrato de levedura e Tween 80 são apresentados na Tabela 9, considerando um intervalo de confiança de 90% ($p < 0,10$).

Tabela 9 Efeitos lineares, quadráticos e das interações do DCCR para a variável resposta atividade de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

Fator	Efeito	Erro puro)	p	Limite de confiança -90%	Limite de confiança +90%
Média	1469,87*	11,22	0,00	1437,10	1502,64
(1) Sacarose (g/L)(L)	-76,20*	10,55	0,02	-107,00	-45,41
Sacarose (g/L)(Q)	8,72	11,62	0,53	-25,21	42,65
(2) Extrato de levedura (g/L)(L)	174,92*	10,55	0,00	144,12	205,71
Extrato de levedura (g/L)(Q)	445,69*	11,62	0,00	411,76	479,62
(3) Tween 80 (ml/L)(L)	1555,46*	10,55	0,00	1524,66	1586,26
Tween 80 (ml/L)(Q)	-201,09*	11,62	0,00	-235,01	-167,16
Interação 1 x 2	-502,94*	13,77	0,00	-543,16	-462,72
Interação 1 x 3	-388,00*	13,77	0,00	-428,22	-347,78
Interação 2 x 3	431,84*	13,77	0,00	391,62	472,06

O modelo que descreve o comportamento de produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides* com base nos fatores sacarose, extrato de levedura, Tween 80 e as interações lineares e quadráticas entre eles encontra-se descrito na Equação 3.

$$PB = 1469,87 - 38,10A + 87,46Y + 222,85Y^2 + 777,73Z - 100,54Z^2 - 251,47A_xY - 194,00A_xZ + 215,92Y_xZ \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que:

PB - produção de bacteriocina (AU/mL);

A - sacarose (g/L);

Y - extrato de levedura (g/L);

Z - Tween 80 (mL/L).

Observou-se que o coeficiente de determinação (R^2) do modelo gerado foi de 0,85. A partir desse valor, pode-se inferir que 85% dos dados são explicados pela equação do modelo no intervalo de 10% de confiança. Dessa forma, para avaliar a qualidade do ajuste do modelo estimado a 10% de significância foi realizada a análise de variância (ANOVA – Tabela 10).

Tabela 10 ANOVA para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides* a partir do DCCR

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	F tab	F/Ftab
Regressão	10462344,63	8	1307793,08	5,63	2,59	2,17
Resíduo	1858584,32	8	232323,04			
Falta de ajuste	1857825,44	6	309637,57	816,04	9,33	87,51
Erro puro	758,88	2	379,44			
Total	12320928,96	16				

Para definir as variáveis significativas, deve-se atender às seguintes premissas:

- Se $F_{cal} \geq F_{tab}$ ou $p\text{-valor} \leq 10\%$: conclui-se que existe efeito das variáveis independentes sobre a variável dependente, no nível de 10% de significância;
- Se $F_{cal} \leq F_{tab}$ ou $p\text{-valor} > 10\%$: conclui-se que não existe efeito das variáveis independentes sobre a variável dependente, no nível de 10% de significância.

Considerando os dados da ANOVA (Tabela 9), verifica-se que para a regressão o $F_{calculado}$ foi maior que o $F_{tabelado}$, indicando que houve efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta atividade de bacteriocinas, no nível de 10% de significância.

A partir dos resultados do delineamento composto central rotacional, foram geradas as superfícies de respostas (Figura 6), que são gráficos gerados por técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, que

descrevem o comportamento de dados que realizam previsões estatísticas (BEZERRA et al., 2008). A metodologia de superfície de resposta otimiza os níveis dos fatores para a obtenção do melhor desempenho no sistema e permite a determinação do modelo matemático que se adapte às variáveis dependentes e independentes. Em outras palavras, a superfície de resposta permite verificar a significância estatística do modelo de regressão da resposta em função da variável independente, representando-a graficamente (LUCENA et al., 2018).

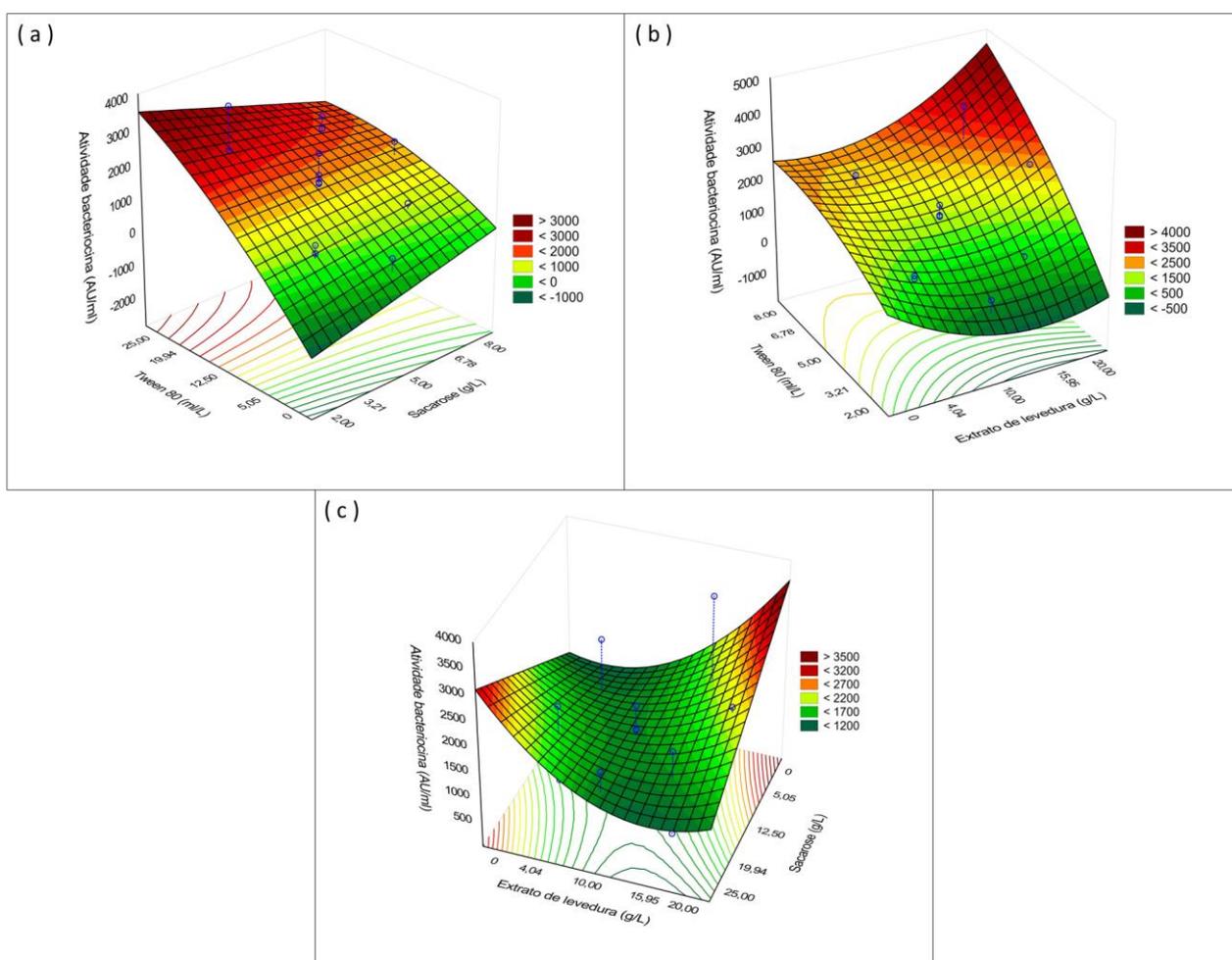


Figura 6 Superfícies de respostas da produção de bacterionas (AU/ml) em função dos fatores sacarose, extrato de levedura e Tween 80
 Legenda: a) efeitos da sacarose e Tween 80; b) efeitos do extrato de levedura e Tween 80; c) efeitos do extrato de levedura e sacarose.

A superfície de resposta que correlaciona o extrato de levedura e a sacarose (Figura 6c) indica que para melhorar a produção de bacteriocinas é necessário utilizar valores dos substratos próximos aos pontos centrais, uma vez que a maior produção está centralizada no gráfico. Para o extrato de levedura, a produção está em torno de 10 g/L; já para a sacarose está em torno de 12,50 g/L.

Já para as superfícies de respostas que correlacionam o extrato de levedura e a sacarose com o Tween 80 (Figuras 6a e 6b), verifica-se que para obter a maior produção de bacteriocinas deve-se aumentar a quantidade de Tween 80 e manter as de sacarose e extrato de levedura próximas do ponto central, ou seja, próximas aos valores médios.

6.3.3.4 Obtenção do ponto ótimo para o processo de produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*

A obtenção do ponto ótimo para o processo de produção de bacteriocinas foi realizada a partir dos dados obtidos no DCCR utilizando a função desirability de Derringer no software Statistica®. Na Figura 7 são ilustradas as curvas de cada uma das variáveis em análise (sacarose, extrato de levedura e Tween 80) em função da variável resposta atividade de bacteriocinas.

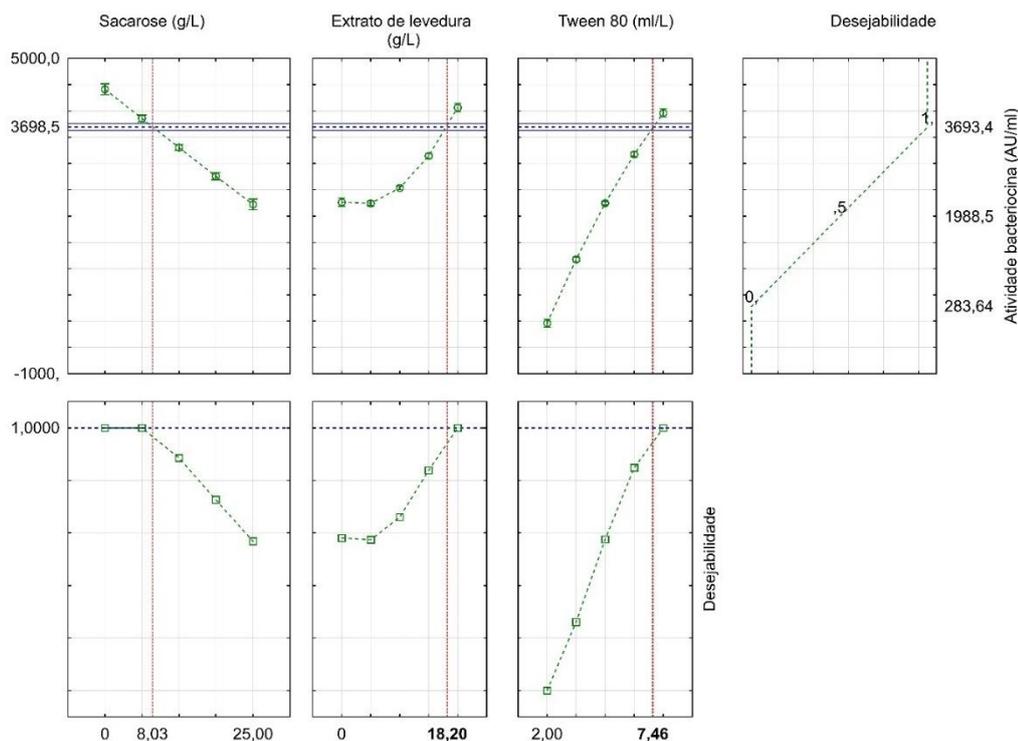


Figura 7 Valores ótimos dos substratos para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*, determinado pelo método de deseabilidade

As concentrações e proporções dos substratos adicionados ao meio de cultivo para cada tratamento influenciam diretamente na produção de bacteriocinas, assim como as fontes de carbono e de nitrogênio (ABBASILIASI et al., 2017). Dessa forma, pode-se inferir que o ponto ótimo compõe um conjunto de fatores que influenciam na atividade bacteriocina. Para este experimento, as concentrações ótimas foram de 8,03 g/L de sacarose; 18,20 g/L de extrato de levedura; e 7,46 ml/L de Tween 80, para a produção de 3693,4 AU/ml.

O uso do delineamento experimental, como o PB e o DCCR, para a obtenção de ponto ótimo na fermentação de bactérias do ácido láctico, tem sido muito utilizados nos últimos anos. Du et al. (2017) isolaram, caracterizaram e otimizaram o processo de fermentação para *Leuconostoc mesenteroides* por meio do PB e do Delineamento Composto Central (DCC) para obtenção de glucansucrase (enzimas que atuam na síntese de polissacarídeos) e verificaram que o uso de delineamento experimental foi muito importante para determinar os efeitos significativos.

Na produção de bacteriocinas, Kumar e Srivastava (2010) utilizaram o PB e a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para analisar as seguintes variáveis: glicose, extrato de levedura, triptona, citrato de triamônio, acetato de sódio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio, pH, período de incubação e Tween 80, para a bacteriocina Enterocin LR/6 da BAL *E.faecium*. Os autores verificaram aumento de 50% na produção de bacteriocina (300 para 606 AU/ml) com o uso do delineamento.

6.4 Conclusões

O estudo demonstra que a *Leuconostoc mesenteroides* possui potencial para a produção de bacteriocinas da água residuária de fecularia de mandioca. A partir das análises de dados do delineamento experimental Plackett-Burman, os fatores selecionados para melhorar a produção foram a sacarose, o extrato de levedura e o Tween 80. O melhor tempo de incubação para o aumento da atividade bacteriocina foi em 20 horas. As concentrações ótimas foram de 8,03 g/L de sacarose; 18,20 g/L de extrato de levedura e 7,46 mL/L de Tween 80, para a produção de bacteriocina de 3693,4 AU/mL.

6.5 Referências

ABBASILIASI, S.; TAN, J. S.; IBRAHIM, T. A. T.; BASHOKOUH, F.; RAMAKRISHNAN, N. R.; MUSTAFA, S.; ARIFF, A. B. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. **RSC Advances**, v. 7, n. 47, p. 29395-29420, 2017.

AHAOTU, N. N.; ANYOGU, A.; OBIOHA, P.; ARIRIATU, L.; IBEKWE, V. I.; ORANUSI, S.; SUTHERLAND, J. P.; OUOBA, L. I. I. Influence of soy fortification on microbial diversity during cassava fermentation and subsequent physicochemical characteristics of garri. **Food Microbiology**, v. 66, p. 165-172, 2017.

AHMAD, V.; KHAN, M. S.; JAMAL, Q. M. S.; ALZOHAIRY, M. A.; KARAAWI, M. A. A.; SIDDIQUI, M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 1, p. 1-11, 2017.

ALLAMEH, S. K.; DAUD, H. H. M.; YUSOFF, F. M.; SAAD, C. R.; IDERIS, A. Isolation,

identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 16, p. 3810-3816, 2012.

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 and Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 887-894, 1998.

AMPE, F.; SIRVENT, A.; ZAKHIA, N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 1-2, p. 45-54, 2001.

ANYOGU, A.; AWAMARIA, B.; SUTHERLAND, J. P.; OUOBA, L. I. I. Molecular characterisation and antimicrobial activity of bacteria associated with submerged lactic acid cassava fermentation. **Food Control**, v. 39, n. 1, p. 119-127, 2014.

AQUINO, S. F. de; SILVA, S. de Q.; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado a análise de efluentes anaeróbios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 11, n. 4, p. 295-304, 2006.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BEZERRA, M. G. S.; SILVA, G. G. C. da; DIFANTE, G. dos S.; EMERENCIANO NETO, J. V.; OLIVEIRA, E. M. M.; OLIVEIRA, L. E. C. de. Cassava wastewater as organic fertilizer in 'marandu' grass pasture. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 6, p. 404-409, 2017.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordnia* e CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

BRUNO, L. M. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos**, 2011. 15p.

CABO, M. L.; MURADO, M. A.; GONZÁLEZ, M. A. P.; PASTORIZA, L. Effects of aeration and pH gradient on nisin production: a mathematical model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4-5, p. 264-273, 2001.

CÁRDENAS, N.; LAIÑO, J. E.; DELGADO, S.; JIMÉNEZ, E.; VALLE, M. J.; GIORI, G. S. de; SESMA, F.; MAYO, B.; FERNÁNDEZ, L.; LEBLANC, J. G.; RODRÍGUEZ, J. M. Relationships between the genome and some phenotypical properties of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4343-4353, 2015.

CARVALHO, J. D. de; NEVES, F. L.; SILVA, C. D. da; BITTENCOURT, M. A. L. Aspectos biológicos e ação inseticida de espécies vegetais sobre imaturos da mosca-negra-dos-citros (*Aleurocanthus woglumi* Ashby-Hemiptera: Aleyrodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 5, 2017.

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, n. 3, p. 229-233, 1998.

CHEIGH, C.-I.; CHOI, H.-J.; PARK, H.; KIM, S.-B.; KOOK, M.-C.; HWANG, J.-K.; PYUN, Y.-R. 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, n. 3, p. 225-235, 2002.

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

COULIN, P.; FARAH, Z.; ASSANVO, J. B.; SPILLMANN, H.; PUHAN, Z. Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 131-136, 2006.

D'ANGELO, L.; CICOTELLO, J.; ZAGO, M.; GUGLIELMOTTI, D.; QUIBERONI, A.; SÁREZ, V. *Leuconostoc* strains isolated from dairy products: Response against food stress conditions. **Food Microbiology**, v. 66, p. 28-39, 2017.

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 and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 166-173, 1993.

DJENI, N. T. BOUATENIN, J.-P. K. M.; ASSOHOUN, N. M. C.; TOKA, D.; MENAN, H.; XAVIER, D.; DJÉ, K. M. Biochemical and microbial characterization of cassava inocula from the three main attiéke production zones in Côte d'Ivoire. **Food Control**, v. 50, p. 133-140, 2015.

DU, R.; XING, H.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Isolation, characterisation and fermentation optimisation of glucansucrase-producing *Leuconostoc mesenteroides* DRP105 from sauerkraut with improved preservation stability. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 12, p. 2522-2530, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th. ed. Washington, DC.: American Public Health Association, 2005.

EDWARD, V. A.; HUCH, M.; DORTU, C.; THONART, P.; EGOUNLETY, M.; ZYL, P. van; SINGH, S.; HOLZAPFEL, W.; FRANZ, C. M. A. P. Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. **Food Control**, v. 22, n. 3-4, p. 389-395, 2011.

FRANCO-CENDEJAS, R.; COLÍN-CASTRO, C. A.; HERNÁNDEZ-DURÁN, M.; LÓPEZ-JÁCOME, L. E.; ORTEGA-PEÑA, S.; CERÓN-GONZÁLEZ, G.; VANEGAS-RODRÍGUEZ, S.; MONDRÁGON-EGUILUZ, J. A.; ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. *Leuconostoc mesenteroides* periprosthetic knee infection, an unusual fastidious Gram-positive bacteria: A case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2017.

FURTADO, D. N.; TODOROV, S. D.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* DF04MI isolated from goat milk: Characterization of the bacteriocin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1541-1550, 2014.

GE, J.; KANG, J.; PING, W. Effect of Acetic Acid on Bacteriocin Production by Gram-Positive Bacteria. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 9, p. 1341-1348, 2019.

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MAÑUNGA, 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, n. 19, p. 8120-8131, 2016.

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, n. 3, p. 267-281, 2001.

JOZALA, A. F. **Produção de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado, com ou sem suplementação, como meio de cultivo**. 2005. 93f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

KARLAPUDI, A. P. et al. Plackett-Burman design for screening of process components and their effects on production of lactase by newly isolated *Bacillus* sp. VUVD101 strain from Dairy effluent. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 543-546, 2018.

KIVANÇ, M.; FUNDA. E. G. A functional food: a traditional Tarhana fermentation. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 269-274, 2017.

KOSTINEK, M. H. N.; HANAK, A.; SPECHT, I.; DORTU, C. M.; THORNART, P.; MBUGUA, S.; HOLZAPFEL, W. H.; HERTEL, C.; FRANZ, C. M. A. P. Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentations for Gari production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 258-267, 2008.

KUMAR, M.; SRIVASTAVA, S. Antilisterial activity of a broad-spectrum bacteriocin, Enterocin LR/6 from *Enterococcus faecium* LR/6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, p. 698-706, 2010.

KUMARIYA, R.; GARSA, A. K.; RAJPUT, Y.; SOOD, S.; AKHTAR, N.; PATEL, S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 171-177, 2019.

LEE, S.; KIM, M. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR isolated from kimchi possesses α -glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity, and cholesterol-lowering effects. **LWT**, v. 116, 2019.

LEI, V.; AMOA-AWUA, W. K. A.; BRIMER, L. Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n. 2-3, p. 169-184, 1999.

LEWIS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 2, p. 145-150, 1991.

LIU, C.; LIU, Y.; LIAO, W.; WEN, Z.; CHEN, S. Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey: optimization of fermentation conditions through statistically based experimental designs. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 113-116, p. 627-38, 2004.

LIU, S.-Q. **Lactic Acid Bacteria**: *Leuconostoc* spp. In Reference module in food science. Amsterdam: Elsevier, 2016.

LIU, X.; CHUNG, Y.-K.; YANG, S.-T.; YOUSEF, A. E. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 13-24, 2005.

LOSTEINKIT, C.; UCHIYAMA, K.; OCHI, S.; TAKAOKA, T.; NAGAHISA, K.; SHIOYA, S. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 91, n. 4, p. 390-5, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; CONVERTI, A.; COTTER, P. D.; OLIVEIRA, R. P. S. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 482-488, 2013.

MASUDA, Y.; ONO, H.; KITAGAWA, H.; ITO, H.; MU, F.; SAWA, N.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Identification and Characterization of Leucocyclicin Q, a Novel Cyclic Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 8164-8170, 2011.

MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H.; TSAKALIDOU, E.; METAXOPOULOS, J. *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 191-198, 2004.

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*. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 297-306, 2015.

OGUNTOYINBO, F. A.; DODD, C. E. R. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in gari production. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 306-312, 2010.

OKUDOH, V.; TROIS, C.; WORKNEH, T. S.; SCHMIDT, S. The potential of cassava biomass and applicable technologies for sustainable biogas production in South Africa: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 1035-1052, 2014.

OLIVEIRA, M. A.; REIS, E. M.; NOZAKI, J. Biological treatment of wastewater from the cassava meal industry. **Environmental Research**, v. 85, n. 2, p. 177-183, 2001.

OMAR, N. B.; AMPE, F.; RAIMBAULT, M.; GUYOT, J.-P.; TAILLIEZ, P. Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). **Systematic and Applied**

Microbiology, v. 23, n. 2, p. 285-291, 2000.

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

ÖZOGUL, F.; HAMED, I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 10, p. 1660-1670, 2018.

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, n. 6, p. 1557-1563, 2007.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 52, n. 5, p. 628-38, 1999.

PAULA, A. T.; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. de 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 Cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3-4, p. 186-197, 2014.

PAULA, A. T. de; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; TODOROV, S. D.; PENNA, A. L. B. The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. **Food Reviews International**, v. 31, n. 2, p. 147-171, 2015.

PENIDO, F. C. L.; PILÓ, F. B.; SANDES, S. H. de C.; NUNES, Á. C.; COLEN, G.; OLIVEIRA, E. de S.; ROSA, C. A.; LACERDA, I. C. A. Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 823-831, 2018.

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

POLTHANEE, A.; SRISUTHAM, M. Growth, yield and water use of drip irrigated cassava planted in the late rainy season of Northeastern Thailand. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 52, n. 5, p. 554-559, 2018.

PONGTHARANGKUL, T.; DEMIRCI, A. Evaluation of Culture Medium for Nisin Production in a Repeated-Batch Biofilm Reactor. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 1, p. 217-224, 2006.

RAMOS, C. L.; SOUSA, E. S. O. de; RIBEIRO, J.; ALMEIDA, T. M. M.; SANTOS, C. C. A. do. A.; ABEGG, M. A.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical characteristics of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. **Food Microbiology**, v. 49, p. 182-188, 2015.

RANI, P. S.; AGRAWAL, R. Effect on Cellular Membrane Fatty Acids in the Stressed Cells of *Leuconostoc Mesenteroides*: A Native Probiotic Lactic Acid Bacteria. **Food Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 47-63, 2008.

RIBEIRO, J. E. S.; MARTINI, A. M. da S.; MARTINI, M.; SORCE, C.; ANDREUCCI, A.;

MELO, D. J. N. de; SILVA, F. L. H. da. Rhodotorula glutinis cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, n. 22, 2019.

ROSA, C. M.; FRANCO, B.; MONTVILLE, T. J.; CHIKINDAS, M. L. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, Lactobacillus sake 2a. **Journal of Food Safety**, v. 22, n. 1, p. 39-54, 2002.

SILVA, C. C. G.; SILVA, S. P. M.; RIBEIRO, S. C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 591, 2018.

ŞİMŞEK, Ö.; CON, A. H.; AKKOÇ, N.; SARIS, P. E. J.; AKCELIK, M. Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered Lactococcus lactis strains. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 481-490, 2009.

SOUTO, L. R. F.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M. S.; FIORDA, F. A.; GARCIA, M. C. Utilization of residue from cassava starch processing for production of fermentable sugar by enzymatic hydrolysis. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 19-24, 2016.

STILES, M. E. Bacteriocins Produced by Leuconostoc Species. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2718-2724, 1994.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Production of Bacteriocin ST33LD, Produced by Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides, as Recorded in the Presence of Different Medium Components. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1585-1590, 2005.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 11-19, 2006.

TODOROV, S. D.; OLIVEIRA, R. P. S.; VAZ-VELHO, M. Media optimization of bacteriocin ST22Ch production by Lactobacillus sakei ST22Ch isolated from salpicão, a traditional meat-product from Portugal. In: Italian Association of Chemical Engineering - AIDIC, **Anais... Chemical Engineering Transactions**, Milão, v. 27, p. 283-288, 2012.

TORRES, D. G. B.; LUCAS, S. D. M.; ANDREANI, C. L.; CARVALHO, K. Q. de; 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**, v. 37, n. 1, p. 160-172, 2017.

VIGNOLO, G. M.; KAIRUZ, M. N. de; HOLGADO, A. A. P. de R.; OLIVER, G. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by Lactobacillus casei CRL 705. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 1, p. 5-10, 1995.

VILVERT, R. M. **Obtenção de bacteriocina de bactérias lácticas em água residuária de indústria de fécula de mandioca**. 2019. 93f. Tese (Doutorado em engenharia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Unioeste - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2019.

VON MOLLENDORFF, J. W.; TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Optimization of Growth Medium for Production of Bacteriocins Produced By *Lactobacillus Plantarum* Jw3Bz and Jw6Bz, and *Lactobacillus Fermentum* Jw11Bz and Jw15Bz Isolated From Boza. **Trakia Journal of Sciences**, v. 7, n. 1, p. 22-33, 2009.

WAYAH, S. B.; PHILIP, K. Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermencin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, 2018.

WILAI PUN, P.; ZENDO, T.; SANGJINDAVONG, M.; NITISINPRASERT, S.; LEELAWATCHARAMAS, V.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Influence of Physical Factors and Various Complex Media on Growth and Bacteriocin Production of Two-synergistic Peptide with Heat Stable Bacteriocin Producer, *Enterococcus faecium* NKR-5-3, Isolated from Thai Fermented Fish. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, v. 36, p. 268-277, 2002.

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, n. 2, p. 194-203, 2008.

ZHANG, P.; ZHANG, P.; WU, J.; TAO, D.; WU, R. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* on physicochemical and microbial succession characterization of soybean paste, Da-jiang. **LWT - Food Science and Technology**, v. 115, 2019.

ZHAO, Y.; HONG, K.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; ZHAI, Q.; CHEN, W. *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 21-32, 2019.

7 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR *Lactobacillus fermentum* E *Leuconostoc mesenteroides* EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

As maiores produções de bacteriocinas no delineamento Plackett-Burman para *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* foram de 3438,84 e 1990,47 AU/mL, respectivamente. Avaliando estatisticamente as médias das maiores produções das bactérias lácticas pelo teste de comparação de médias T-student de amostras independentes, verifica-se que com 10% de significância os valores de produção são diferentes, uma vez que o p-valor foi de $0,0024 < 0,10$. Dessa forma, estatisticamente verifica-se que a produção de bacteriocinas foi melhor para a *Lactobacillus fermentum*. No gráfico de comparação das produções (Figura 6) para os 15 ensaios, fica evidente que a *Lactobacillus fermentum*, no geral, produziu mais bacteriocinas do que a *Leuconostoc mesenteroides* com condições de crescimento iguais (30 °C, 100 rpm, 36 h, água residuária da fécula de mandioca suplementada com os respectivos níveis do PB).

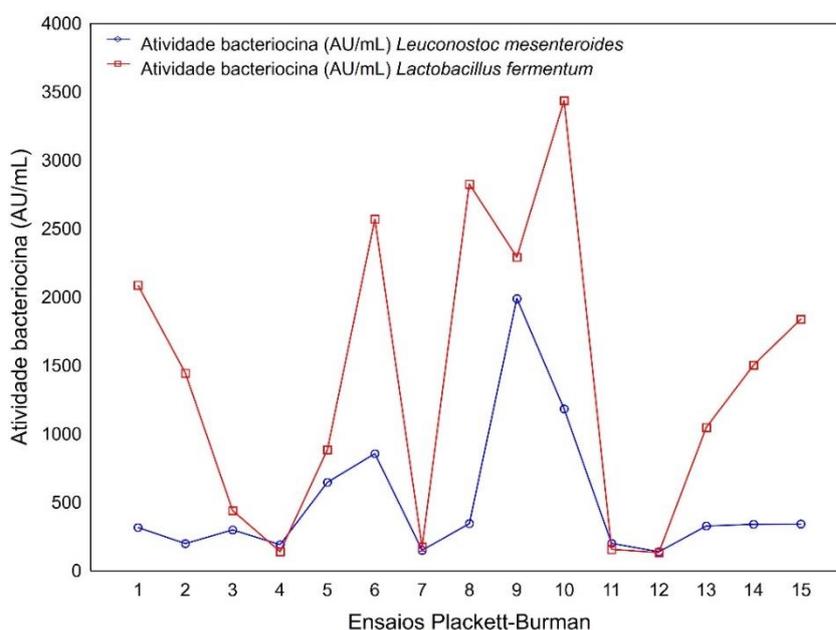


Figura 1 Comparação da produção de bacteriocinas por *Lactobacillus Fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* para os ensaios do delineamento Plackett-Burman.

Os fatores que influenciaram a produção de bacteriocinas no Plackett-Burman para ambas as cepas foram os mesmos, sendo a sacarose, o extrato de levedura e o Tween 80. A partir dos ensaios foi perceptível verificar que o Tween 80, tanto para *Lactobacillus fermentum*, quanto para *Leuconostoc mesenteroides*, foi o fator mais significativo para a

produção de bacteriocinas. A menor produção de bacteriocinas para ambas as cepas foi no ensaio 12, uma vez que não foi adicionado nenhum substrato à água residuária de fecularia.

O estudo cinético realizado para ambas as cepas ocorreu por 35 h, com amostras retiradas a cada 5 h. Para a *Lactobacillus fermentum* foram adicionados 20 g/L de sacarose e 4 mL/L de Tween 80; já para *Leuconostoc mesenteroides*, foram adicionados 1,14 g/L de sulfato de magnésio e 4 mL/L de Tween 80 – esses níveis foram escolhidos por serem as melhores produções para as respectivas cepas. O melhor tempo de fermentação foi de 20 h, tanto para *Lactobacillus fermentum* quanto para *Leuconostoc mesenteroides*.

No Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) os fatores que foram avaliados para a produção de bacteriocinas, para ambas as cepas, foram sacarose, extrato de levedura e Tween 80. Para *Lactobacillus fermentum*, o ensaio 14 teve a maior produção de bacteriocinas (11751,03 AU/mL); já para a *Leuconostoc mesenteroides*, foi o ensaio 7 (3693,35 AU/mL). Comparando-se as médias das maiores produções de ambas as cepas pelo teste T-student, foi avaliado que estatisticamente a 10% de significância, os valores de produção são diferentes, com p-valor de $0,04 < 0,10$. Assim como no PB, a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum*, no geral, foi maior que a do *Leuconostoc mesenteroides* com condições de crescimentos iguais, 30 °C, 100 rpm, 20 h e água residuária da fécula de mandioca suplementada com os respectivos níveis do DCCR (Figura 3).

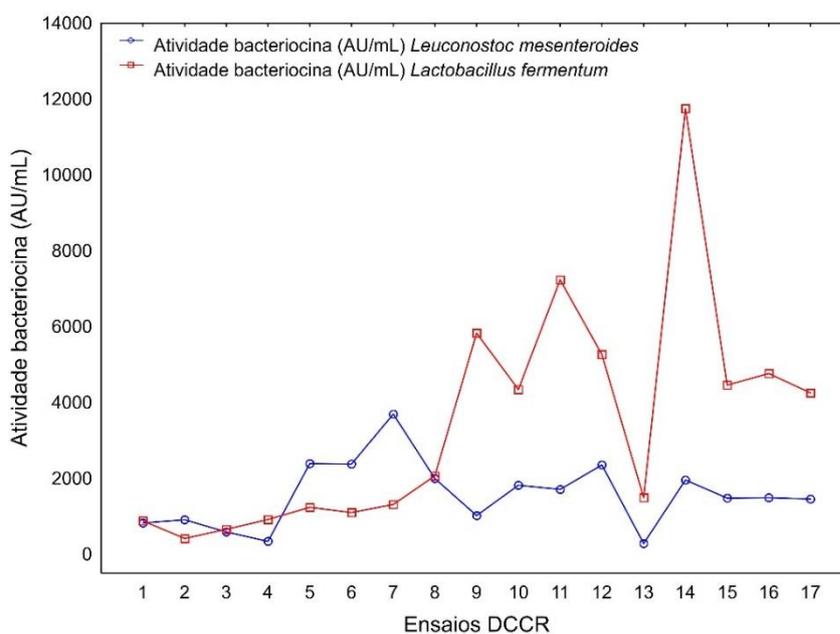


Figura 2 Comparação da produção de bacteriocinas por *Lactobacillus Fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

As diferentes taxas de produções para *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* para o PB e DCCR, mesmo com condições iguais de crescimento, pode ter ocorrido por características dos gêneros que são diferentes (*Lactobacillus* e *Leuconostoc*), pela escolha do pH inicial (6,0), temperatura (30 °C) e agitação (100 rpm), que foram iguais para ambas as cepas. Provavelmente, a *Lactobacillus fermentum* se adaptou melhor nessas condições de crescimento, ao contrário da *Leuconostoc mesenteroides*. Dessa forma, para trabalhos futuros é importante avaliar condições adequadas para a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*.

O pH após a fermentação também é um fator de importância que distingue as duas cepas. Para avaliar a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*, foi necessário abaixar o pH para 2,5, para que as bacteriocinas se dissociassem da membrana celular (PENNA et al., 2006). Para a *Lactobacillus fermentum* foi verificado que o abaixamento do pH para 2,5 diminuía significativamente os valores de produção de bacteriocinas. Pascual (2008), avaliando diferentes valores de pH para a *Lactobacillus fermentum*, verificou que o pH entre 5,0 e 5,5 é o ideal para a produção de bacteriocinas. É importante ressaltar que o pH após da fermentação para *Lactobacillus fermentum* para o PB e o DCCR esteve sempre acima de 4,0. Os diferentes comportamentos das moléculas de bacteriocinas indicam que, embora as duas cepas apresentem produção de bacteriocinas, os compostos são diferentes e, portanto, podem apresentar modos de ações diferentes.

Os resultados dos ensaios do DCCR, para ambas as cepas, foram avaliados no software Statistica®, sendo gerados modelos lineares para a produção de bacteriocinas (indicados nos artigos 1 e 2). Os modelos foram comparados por diferentes critérios de seleção (AIC, R², R² ajustado e BIC), a fim de avaliar qual o melhor modelo que estimasse a melhor produção de bacteriocinas considerando as variáveis independentes (sacarose, extrato de levedura e Tween 80) e a variável dependente (produção de bacteriocinas). As comparações são apresentadas na Tabela 23.

Tabela 1 Comparação do modelo linear da produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* considerando diferentes critérios de seleção (AIC, R², R² ajustado e BIC)

Modelo linear	AIC	R ²	R ² Ajustado	BIC
<i>Lactobacillus fermentum</i>	320,51	0,40	-0,18	328,84
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	265,48	0,84	0,69	273,81

Legenda: AIC (Critério de Informação de Akaike) e BIC (Critério Bayesiano de Schwarz).

Analisando os valores indicados na Tabela 23, pode-se concluir a partir dos diferentes critérios de seleção que:

- AIC (critério de informação de Akaike): Este critério estima o melhor modelo, considerando o número de variáveis do modelo e a qualidade das ligações entre elas. Para o AIC, quanto menor for o valor relacionado a ele, melhor será o modelo que se ajusta aos dados. Assim, para este estudo, o modelo que menos se ajustou foi o de *Lactobacillus fermentum* (320,51);

- Coeficiente de determinação e ajustado (R^2 e R^2 ajustado): Tal coeficiente indica o quanto o modelo é capaz de explicar os dados; o melhor modelo deve estar próximo de 1. Considerando os dois modelos, verifica-se que o melhor foi para *Leuconostoc mesenteroides*, uma vez que o R^2 obtido foi de 0,84 e para o R^2 ajustado de 0,69; assim, infere-se que cerca de 84% dos dados são explicados por esse modelo.

- BIC (critério de informação bayesiano): Assim como o critério AIC, para o BIC quanto menor for o valor relacionado a ele, melhor será o ajuste do modelo. Dessa forma, o melhor modelo foi para *Leuconostoc mesenteroides* com um BIC de 273,81.

Considerando todos os critérios de seleção, verifica-se que o modelo para *Leuconostoc mesenteroides* foi o melhor. Dessa forma, pode-se inferir que mesmo que a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum* tenha sido maior, é necessário realizar ajustes nos níveis das variáveis independentes (sacarose, extrato de levedura e Tween 80), para melhorar o modelo e, conseqüentemente, aumentar ainda mais a produção de bacteriocinas.

Para verificar a produção de bacteriocinas com ambas as cepas (cocultivo), foi formado um inóculo da cultura de bactéria láctica mista (5 ml do inóculo de *Lactobacillus fermentum*, 5 mL do inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* e 90 mL de caldo MRS para completar o volume, sendo incubado por 16 h, 100 rpm, 30 °C). Nesse experimento, 5 mL do inóculo da cultura mista foi adicionado em 45 mL água residuária da fécula de mandioca suplementada com 25 g/L de sacarose, 10 g/L de extrato de levedura e 5 mL/L de Tween 80 – Ensaio 10 do DCCR (metodologia detalhada nos artigos 1 e 2). A produção de bacteriocinas com a mistura mista *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* (30 °C, 100 rpm, 20 h) é apresentada na Tabela 24.

Tabela 2 Produção de bacteriocinas (AU/mL) por cultura mista de *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* e pelas cepas individuais

	Produção de bacteriocina (AU/mL)
Cultura mista (<i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	421,63
<i>Lactobacillus fermentum</i>	4349,23
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1818,81

A produção de bacteriocinas pela cultura mista de *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* foi baixa (421,63 AU/mL), em comparação com as produções

obtidas para as cepas em monocultura (Tabela 24). A baixa produção de bacteriocinas pela cultura mista pode estar vinculada às características e necessidades de cada microrganismo, com a possível inibição de cada um deles pelas respectivas bacteriocinas produzidas.

Um teste de incompatibilidade entre as bactérias foi realizado para verificar a possível inibição de ambas perante as bacteriocinas produzidas pela outra cepa, durante a fermentação. Para tanto, cada cepa foi plaqueada em meio ágar TSA suplementado com sangue de carneiro, sendo submetida à ação das bacteriocinas produzidas pela outra cepa, através do teste de antagonismo (inserção dos microrganismos nos poços no meio ágar). Na Tabela 25 são apresentados os resultados da inibição.

Tabela 3 Teste de incompatibilidade entre as bactérias do ácido láctico *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*

Bacteriocinas dos microrganismos inoculados no orifício (poço)	Halo de inibição (mm) dos microrganismos alvo	
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	11,65
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14,47	-

Os resultados apresentados na Tabela 25 demonstram que ocorreu incompatibilidade de crescimento entre as bactérias do ácido láctico *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*, uma vez que os microrganismos apresentaram halo de inibição em relação ao outro. Dessa forma, infere-se que a baixa produção de bacteriocinas pela cultura mista ocorreu pela incompatibilidade entre as cepas. Verifica-se que a *Lactobacillus fermentum* exerceu uma maior influência no crescimento de *Leuconostoc mesenteroides*, uma vez que o halo de inibição foi maior.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de bacteriocinas por *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* a partir da água residuária da fécula de mandioca mostrou potencial de produção de bacteriocinas. Assim, torna-se relevante projetar uma continuidade de estudos que avaliem:

- Isolar outras bactérias produtoras de bacteriocinas da água residuária do processamento da mandioca, como, por exemplo, *Lactococcus lactis*, produtora da bacteriocina nisina;
- Aumentar a produção de *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* em escala de bancada, utilizando reatores anaeróbios para o cultivo;
- Avaliar outros fatores para melhorar a produção das bacteriocinas e diminuir o custo com meios de cultivos de elevado custo, como o extrato de levedura;
- Verificar a atividade antimicrobiana das cepas em relação a bactérias patogênicas;
- Encapsular as bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*, para verificar sua ação na preservação de alimentos.

ANEXO



(48) 3012.5745
neoprosecta.com.br
contato@neoprosecta.com

Relatório de ensaio Neo 10002718/2019

Cliente: UNIOESTE - Aruani Tomoto

E-mail: arutomoto@hotmail.com

Telefone: (44)998506729

Ordem de recebimento 181499.1

Número de amostras: 1

Data de emissão do relatório: 17/01/2020

Amostra 191024111510

Descrição: Isolado da fécula de mandioca_Unioeste- Cascavel *

Observações de recebimento: Aceita

Condição do recebimento: Ambiente

Matriz: Isolado de microrganismo em NeoSample-X

Resultados

Ensaio: DMD Bactéria - Sequenciamento de alto desempenho - gene 16S rRNA região V3-V4

Identificação	Número de seqüências de DNA	Proporção por amostra (%)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1.146	99,48
<i>Bacillus cereus sp. group</i>	6	0,52

Informações referentes aos métodos

Método

DMD - Diagnóstico Microbiológico Digital - Identificação de microrganismos por sequenciamento de DNA.

Equipamento

MiSeq Sequencing System - Illumina

* **Dados fornecidos pelo cliente.**

Notas

Nota 1: Os resultados apresentados no presente relatório se aplicam a amostra conforme recebida.

Nota 2: Os resultados referem-se somente aos itens ensaiados.

Nota 3: Este relatório de ensaio só pode ser reproduzido por completo.



(48) 3012.5745
neopropecta.com.br
contato@neopropecta.com

Dr. Rafael R. de Oliveira
CRBio-03 nº 095815/03-D
Coordenador Técnico