

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica – Farmacêutica  
Área de Tecnologia em Alimentos

**Produção de nisina por *Lactococcus lactis subsp. lactis*  
ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado,  
com ou sem suplementação, como meio de cultivo**

Angela Faustino Jozala

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientadora: Profa. Tit. Dra. Thereza  
Christina Vessoni Penna

São Paulo  
2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Angela Faustino Jozala

**Produção de nisina por *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado, com ou sem suplementação, como meio de cultivo**

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## DEDICATÓRIA

A Deus por iluminar sempre meu caminho,  
A meu filho, Daniel, por todo seu carinho,  
A minha mãe, Selma, por seu amor incondicional,  
Ao meu namorado, Décio, por todo seu incentivo.

## AGRADECIMENTOS

- A minha orientadora Professora Thereza Christina Vessoni Penna, pela amizade, confiança, dedicação e por sempre acreditar em nosso trabalho.
- Ao colega Dante Moraes por suas orientações e auxílios, no desenvolvimento do projeto.
- A todos os professores, do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pelo incentivo e colaboração.
- Aos funcionários colegas de laboratório: Ricardo, Irene, Marilene, Cândida, Mauro, Graça, Sônia e Gledson, meus agradecimentos.
- A todos os funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, por toda colaboração.
- Aos colegas de laboratório, da pós-graduação e iniciação científica: André, Ângelo, Carlota, Carolina, Estér, Luiz Carlos, Marina, Priscila, Tábata, Helen, Thomás, Letícia, Juliana, Maura, Mariane, Hélio e Márcio. Por todo o tempo de amizade, companheirismo e espírito de equipe.
- Aos amigos de iniciação científica, que diretamente, acompanharam e colaboraram com o crescimento do projeto: Letícia, Thomás e Maura.
- A todos meus amigos, uma lista infinita de nomes, que de alguma forma me ajudaram a crescer, e sempre estiveram ao meu lado.
- A Priscila e Letícia pela infinita amizade.
- À agência de fomento, Capes, pelo suporte financeiro.

## EPÍGRAFE

As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém, leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se tudo se desmancha no ar menos os pensamentos.

(Paulo Baleki)

O sucesso resulta de cem pequenas coisas feitas de forma um pouco melhor. O insucesso, de cem pequenas coisas feitas de forma um pouco pior.

(Henry Kissinger)

## RESUMO

Nisina é extensamente utilizada como conservante natural em alimentos por conter características antimicrobianas contra germinação de esporos e bactérias Gram-positivas; potencialmente utilizada para produtos odontológicos e farmacêuticos, e como um agente terapêutico. Este estudo teve por objetivo melhorar a produção da nisina em diferentes meios de cultivo incluindo o leite desnatado. Com a expressão de nisina relacionada às condições de crescimento do *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454, a interferência dos componentes dos meios de cultivo, os parâmetros de crescimento e o tempo de incubação foram estudados para a obtenção desta bacteriocina. O cultivo do *L. lactis* foi realizado (36h/100rpm/30 °C) em caldo M17 e MRS em sua composição básica (pH = 6-7) e também suplementado com sacarose (1,0-12,5 g.L<sup>-1</sup>); fosfato de potássio (0,13 g.L<sup>-1</sup>), asparagina (0,5 g.L<sup>-1</sup>) e sacarose (0,24 g.L<sup>-1</sup>); e diluído 1:1 com leite desnatado. O leite desnatado foi também utilizado como meio de cultivo mantendo sua composição básica (9–10 % sólidos totais, pH = 6,5). Alíquotas do cultivo em caldo (OD<sub>660</sub> = 0,7; 3,20 mg DCW/L ou 10<sup>2</sup> CFU/mL) de cada grupo de ensaio foram transferidas para um novo meio de cultivo e incubado (36h/100rpm/30 °C). A produção de nisina foi detectada através da difusão em ágar utilizando *Lactobacillus sake* ATCC 15521 (30 °C/24h) como microrganismo sensível. A atividade detectada foi expressa em AU (arbitrary units – unidades arbitrárias), correspondendo aos halos de inibição de crescimento de *L. sake*. As unidades arbitrárias foram convertidas para concentração de nisina padrão (Nisaplin® contém 25 mg<sub>nisina</sub> / g<sub>produto</sub>, correspondem a 10<sup>6</sup> AU). A detecção da atividade da nisina foi menor do que 0,1 AU.mL<sup>-1</sup> em caldo M17e MRS, aumentando significativamente para 142527,94 AU.mL<sup>-1</sup> em M17 ou MRS diluído com leite desnatado (1:1). A atividade da nisina detectada foi altamente influenciada pela incorporação de leite desnatado em ambos o caldo, MRS e M17, com a máxima quantidade expressa em 36 horas de incubação. Os resultados mostram que o leite desnatado com meio de cultivo desenvolve ambiente propício e ideal para a produção de nisina, pois reduz os custos e aumenta a produção, por se tratar de um produto de fácil acesso e trivial.

## ABSTRACT

Nisin is a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* that inhibits the germination and growth of Gram-positive bacteria. As Nisin expression is related to the growth conditions of *Lactococcus lactis subsp. lactis*, the effects of growth parameters, media components and incubation time, were studied to optimize the expression of Nisin. *L. lactis* ATCC 11454 was grown (36h/100rpm/30°C) in both M17 and MRS basic broth media (pH = 6-7) supplemented with sucrose (1.0-12.5 g L<sup>-1</sup>); potassium phosphate (0.13 g L<sup>-1</sup>), asparagine (0.5 g L<sup>-1</sup>) and sucrose (0.24 g L<sup>-1</sup>); and diluted 1:1 with liquid non-fat milk. Liquid non-fat milk, undiluted, was also used as another basic medium (9–10 % total solids, pH = 6.5). Aliquots of cultured broth (OD<sub>660</sub> = 0.7; 3.20 mg DCW/L or 10<sup>2</sup> CFU/ml) from each group were transferred into fresh broth and incubated further (36h/100/rpm30°C). Nisin production was assayed by agar diffusion using *Lactobacillus sake* ATCC 15521 (24h/30°C) as the sensitive organism. Comparing diameters of growth inhibition of *L. sake* from wells of Nisin of known concentration (“standard Nisin”; Nisaplin, Sigma) to diameters of inhibition from defined volumes of *L. lactis sp. lactis* broth cultures, the amount of Nisin in broth cultures was measured as arbitrary units (AU ml<sup>-1</sup>) converted to Nisin mg/ml, with 25 mg of standard Nisin/g corresponding to 10<sup>6</sup> AU/g. The detection of Nisin activity was less than 0.1 AU.mL<sup>-1</sup> in M17 or MRS broth, and increased to a maximum of 142527.94 AU.mL<sup>-1</sup> in M17 or MRS diluted with liquid non-fat milk (1:1). The amount of Nisin expressed was strongly influenced by the incorporation of non-fat milk to both M17 and MRS broths (1:1), with the maximum amount expressed after 36 h of incubation. Nisin is widely used as a natural additive for preserving foods, pharmaceutical and dental products, and as a therapeutic agent. This study was performed to improve large scale Nisin production to meet the demand of its beneficial use in health-care products.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da Estrutura de Nisina. Pág. 18
- Figura 2.** Coloração de Gram da cepa de *Lactococcus lactis* ATCC 11454. Pág. 29
- Figura 3.** Coloração de Gram da cepa de *Lactobacillus sake* ATCC 91121. Pág. 29
- Figura 4.1** Relação entre o diâmetro do halo de inibição e atividade de nisina, curva padrão obtida a partir da nisina dissolvida em HCl 0,02 N Pág. 32
- Figura 4.2** Relação entre o diâmetro do halo de inibição e atividade de nisina, curva padrão obtida a partir da nisina dissolvida em leite pH 6,8. Pág. 32
- Figura 4.3** Relação entre o diâmetro do halo de inibição e atividade de nisina, curva padrão obtida a partir da nisina dissolvida em leite pH 2,5 Pág. 33
- Figura 5** Atividade da nisina em AU/l através das transferências nos ensaios utilizando meio de cultivo sintético. Pág. 41
- Figura 5.1** Atividade da nisina em AU/l através das transferências nos ensaios utilizando meio de cultivo sintético em pH 2,5 Pág. 42
- Figura 5.2** Atividade da nisina em AU/l através das transferências nos ensaios utilizando meio natural, leite desnatado. Pág. 50
- Figura 5.3** Atividade da nisina em AU/l através das transferências nos ensaios utilizando meio natural, leite desnatado em pH 2,5 Pág. 50

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Quadro 1.** Principais características que diferenciam bacteriocinas de antibióticos.  
Pág. 10

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultivo utilizando: caldo MRS, leite desnatado e suplementos.  
Pág. 26

**Tabela 2.** Composição dos meios de cultivo utilizando: caldo M17, leite desnatado e suplementos.  
Pág. 27

**Tabela 3.** Atividade de Nisina, produção específica e produtividade nas transferências do cultivo de *L. lactis* ATCC 11454, a cada 36h (30° C, 100 rpm), para meio sintético MRS ou M17.  
Pág. 38

**Tabela 4.** Atividade de Nisina, produção específica e produtividade nas transferências do cultivo de *L. lactis* ATCC 11454, a cada 36h (30° C, 100 rpm), para meio sintético MRS ou M17, com ajuste do valor de pH final para 2,5.  
Pág. 39

**Tabela 5.** Atividade de Nisina, produção específica e produtividade nas transferências do cultivo de *L. lactis* ATCC 11454, a cada 36h (30° C, 100 rpm), para meio natural leite desnatado  
Pág. 47

**Tabela 6.** Atividade de Nisina, produção específica e produtividade nas transferências do cultivo de *L. lactis* ATCC 11454, a cada 36h (30° C, 100 rpm), para meio natural leite desnatado com ajuste do valor de pH final para 2,5.  
Pág. 487

## LISTA DE NOMENCLATURA

kDa: quilo Dalton

Subsp: Subespécie

AU: *Arbitrary Units* – Unidade Arbitrária

mL: Mililitro

L: Litro

mg: miligrama

g: grama

DCW: *Dry weight cell* – Massa seca celular

Spp: Saprofítico

UHT: Ultra high temperature – Temperatura ultra-alta

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *America Type Culture Collection*

h: hora

UFC: Unidade formadora de colônia

CFU: Colony Forming Units

H: halo

SD: *standard deviation* - desvio padrão

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	12
2. Objetivos .....	14
3. Revisão da Literatura .....	15
3.1 Peptídeos antimicrobianos .....	15
3.2 Classificação e Estrutura da Nisina .....	16
3.3 Regulamentação Tóxicológica .....	18
3.4 Bacteriocina Nisina .....	18
3.5 Formação da Nisina .....	20
3.6 Mecanismo de ação .....	20
3.7 Estudo dos Meios de Cultivo .....	21
4. Material e métodos.....	23
4.1. Equipamento.....	23
4.3. Meios de cultura, nutrientes e soluções.....	23
4.4. Cepas bacterianas .....	27
4.5 Determinação do valor de pH.....	28
4.6 Determinação Concentração Celular.....	28
4.7. Determinação da Atividade de Nisina.....	29
4.8 Determinação da produção específica e produtividade .....	31
4.9 Ensaio em meio sintético para produção de Nisina. ....	32
4.10 Ensaio em Meio Natural lácteo para a produção de nisina. ....	33
5. Resultados e discussão .....	34
5.1 Resultados da Produção de Nisina nos Meios Sintéticos .....	34
5.2 Resultados da Produção de Nisina em Meio Misto e Natural .....	41
6. Conclusões .....	48
7. Perspectivas do Trabalho.....	49
8. Bibliografia .....	50
ANEXO I .....	57
ANEXO II .....	75
ANEXO III .....	81
ANEXO IV.....	87
ANEXO V.....	89
ANEXO VI.....	91
ANEXO VII.....	92
APÊNDICE 1.....	93

## 1. Introdução

Produtos de necessidade básica aos seres humanos como os alimentos, devem estar isentos de microrganismos potencialmente patogênicos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos. A sobrevivência de microrganismos em alimentos é de fundamental importância sob o ponto de vista da segurança alimentar e econômico. A tecnologia mais adequada ao processamento de um alimento esta diretamente ligada a microbiota presente. Substâncias naturais antimicrobianas de natureza protéica como bacteriocinas, comprovadamente inofensivas aos seres vivos e ao meio ambiente, sem interferir na qualidade do produto considerado, tem sido objeto de pesquisa mundial.

Nisina, peptídeo antimicrobiano, produzido por *Lactococcus lactis* ATCC 11454, tem o seu uso permitido pela Legislação Brasileira (DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996) como conservante natural de produtos de natureza biológica (queijos, carnes e embalagens de embutidos). Nisina apresenta capacidade de inibir a germinação de esporos e o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas; assim como, de bactérias Gram-negativas, na presença de agentes quelantes, tornando as células sensíveis à ação antimicrobiana. Aplicações deste peptídeo em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de artigos médico-odontológicos têm sido desenvolvidas, assim como a possível utilização da nisina como agente terapêutico (exemplificando, na forma liofilizada em aftas bucais).

Devido a todas estas características torna-se relevante estudar a produção de nisina, unindo-se ao fato de que 25g do produto comercial importado, contendo apenas 2,5% de nisina em seu conteúdo, tem um custo de R\$ 1525,00 (um mil quinhentos e vinte e cinco reais). Obter este produto, de alto valor agregado, nacionalmente, atenuando os custos de produção, foi a principal vertente motivadora para o desenvolvimento deste trabalho, que utiliza diferentes formulações de meio de cultura, com o objetivo fundamental de fazer do leite desnatado um meio de cultivo alternativo, natural e de baixo custo na produção de nisina.

O desenvolvimento deste trabalho foi baseado no estudo da atividade da nisina na germinação de esporos de *Bacillus cereus* durante o processo de pasteurização de formulações lácteas em lactário hospitalar. Nas formulações incorporadas com nisina houve inibição da germinação de esporos, apontando a eficiência de sua utilização como conservante natural e no estudo da produção de

nisina pelo *Lactococcus lactis* ATCC 11454 em caldo MRS, variando as concentrações de sacarose (5,0 - 12,5 g.L<sup>-1</sup>), asparagina (7,5 - 75 g.L<sup>-1</sup>), fosfato de potássio (6,0 - 18,0 g.L<sup>-1</sup>) e tween 80 (1,0 - 6,6 g.L<sup>-1</sup>) para a determinação de qual suplemento era o mais influente (Vessoni Penna, Moraes, D.A. e Fajardo, 2002; Vessoni Penna, T.C e Moraes, D.A. 2002).

## 2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi constatar a produção de nisina por *Lactococcus lactis*, em meio de cultivo natural de baixo custo (leite desnatado). Para isso, foram delineados objetivos secundários onde foram averiguadas a adaptação celular e a produção de nisina pelo microrganismo:

- i. Avaliar a produção de nisina em meios de cultivo sintéticos (MRS e M17) com ou sem a adição de suplementos (asparagina, sacarose e fosfato bibásico de potássio) em condições pré-estabelecidas Moraes, (2002);
- ii. Avaliar a produção de nisina em meios mistos (leite adicionado meios MRS e M17) com ou sem a suplementação de nutrientes extras;
- iii. Avaliar a produção de nisina em meio natural (leite desnatado);

### 3. Revisão da Literatura

#### 3.1 Peptídeos antimicrobianos

As bacteriocinas são proteínas ou complexos de proteínas excretados por bactérias e que se apresentam ativas contra espécies de microrganismos Gram-positivos, incluindo as bactérias ácido lácticas e os esporos do gênero *Bacillus*. Representam um grupo de substâncias antimicrobianas bastante heterogêneo, que variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro bacteriano, ao seu modo de ação, a massa molar e às suas propriedades bioquímicas. (Pelczar, 1996)

Bactérias Gram-positivas, em sua maioria, produzem bacteriocinas menores do que 6 kDa. Aquelas produzidas por bactérias ácido-láticas são divididas em 3 classes (Nes et al, 1996): (I) Lantibióticos; (II) Lantibióticos pequenos não estáveis; e (III) Grandes proteínas lábeis ao calor.

Os lantibióticos são peptídeos antimicrobianos, bacteriocinas, produzidos por uma extensa gama de bactérias Gram-positivas, e são caracterizadas pela presença única de aminoácidos modificados, particularmente o dehidroamino ácidos e os tioéter aminoácidos lantionina (Lan) e 3-metilantionina (MeLan), produzidos por complexos multienzimáticos. Nisina pertence ao subgrupo dos lantibióticos lineares (Banerjee, S. e Hansen, J.N.; 1988), representados pela classe I, onde a classifica como peptídeo termoestável (Thomas L., M. Clarkson e Delves-Broughton, 2000).

Antibióticos não estão inclusos neste grupo porque não são sintetizados pelo ribossomo das células. O quadro 1 mostra as principais características que diferenciam os antibióticos das bacteriocinas.



Quadro 1. Principais características que diferenciam bacteriocinas de antibióticos

Característica	Bacteriocina	Antibiótico
Aplicação	Alimentícia	Clínica
Síntese	Ribossômica	Metabolismo secundário
Atividade	Espectro estreito	Espectro variável
Imunidade à célula hospedeira?	SIM	NÃO
Mecanismo de ação sobre a célula alvo (resistência ou tolerância)	Normalmente é uma adaptação que afeta a composição da membrana celular	Normalmente uma transferência genética que afeta dependendo do modo de ação
Interações necessárias	Eventualmente se adere as moléculas	Alvo específico
Modo de ação	Formação de poros, mas em alguns casos uma possível biossíntese da parede celular	Membrana celular ou alvo intracelular
Toxicidade / Efeitos colaterais	Nenhum conhecido	SIM

### 3.2 Classificação e Estrutura da Nisina

A classificação da nisina deve-se ao termo do “Group N Inhibitory Substance” produzida por estreptococos de Lancefield – Grupo sorológico N ou gênero *streptococci* (Mattick e Hirsh, 1947). A estrutura do peptídeo nisina foi primeiramente descrita por Gross e Morell (1971), mas geneticamente isolada por Buchman, Banerjee e Hansen, 1988.

Kaletta e Entian (1989) também evidenciam a caracterização da estrutura de um gene da nisina, *nisA*, o qual está situado em um plasmídeo e codificado por 57 aminoácidos. Existem duas variantes naturais de nisina existentes, a nisina A e a nisina Z, as quais diferem em apenas um simples aminoácido na posição 27. A asparagina na nisina Z é substituída por histidina na nisina A (Graeffe et al. 1991; de

Vos et al, 1991). A substituição do aminoácido é devida à troca de um simples par de bases para o códon correspondente. As diferenças entre as variantes de nisina são pequenas. A nisina Z parece ser ligeiramente mais difusível em ágar e mais solúvel em pH neutro (Mulders et al, 1991).

A nisina tem massa molar de 3,5 kDa (Hurst 1981). Sua biossíntese ocorre em duas fases. Primeiramente um peptídeo precursor é sintetizado ribossomicalmente seguindo pela pós-translocação enzimática convertendo o precursor inativo em um peptídeo bioativo. Estas modificações incluem hidratação de aminoácidos específicos serina e a treonina residuais, com subsequente adição de cisteína e uma dupla camada de dideidroaminoácidos resultando na formação de pontes de tioéter (De Vuyst e Vandamme, 1992).

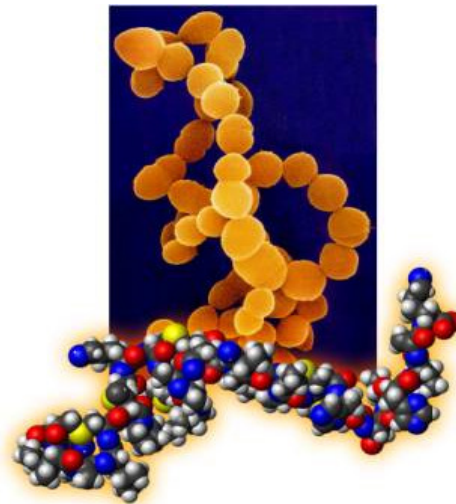


Figura 1. Estrutura da Nisina

### 3.3 Regulamentação Toxicológica

Extensivos estudos toxicológicos realizados com a nisina demonstraram que a sua ingestão não causa efeitos tóxicos ao organismo humano, sendo reportada uma DL50 de 6950 mg/kg, similar ao consumo de sal, quando administrada oralmente. Com base no nível “no effect” observado nas avaliações toxicológicas realizadas em animais e permitido para humanos, a Organização Mundial da Saúde recomenda a Ingestão Diária Aceitável-IDA (“Acceptable Daily Intake” - ADI que apresenta a quantidade máxima do aditivo que poderia ser ingerida diariamente, sem causar quaisquer danos à saúde do consumidor) de 33000 Unidades Internacionais (UI) (0,825 mg) por quilo de peso corpóreo (Hoover e Steenson, 1993).

A nisina é considerada não tóxica para seres humanos, uma vez que ocorre comumente na natureza. É rapidamente inativada pela quimiotripsina, enzima produzida no pâncreas e liberada no intestino delgado, e é sensível à ptialina, não sendo detectada na saliva de humanos após 10 minutos do consumo de líquidos contendo essa bacteriocina. É também a única bacteriocina que foi confirmada como GRAS “Generally Regarded as Safe” e de uso liberado como aditivo alimentar pelo comitê do *Codex Alimentarius*, da FAO, para uso como agente antimicrobiano na inibição do desenvolvimento pós-germinativo de esporos e formação de toxina por *C. botulinum* em queijos fundidos e pasteurizados (Chandrapati e O’Sullivan, 1998).

### 3.4 Bacteriocina Nisina

Nisina e outros lantibióticos do subtipo A são caracterizados pela extensa atividade bactericida inibindo a germinação de esporos (Vessoni Penna, Moraes e Fajardo, 2001) e o crescimento de variadas cepas de bactérias gram-positivas (de Vuyst e Vandamme, 1993). A nisina é usada como um conservante natural nas indústrias de alimentos e laticínios, aprovadas pelo FDA e GRAS (Cleveland *et al.*, 2001).

Comercialmente a nisina é um produto denominado Nisaplin®, e tem grande utilização em produtos como: requeijão, queijos fundidos, ricota, sobremesas lácteas, queijos obtidos por ultrafiltração, salsichas, mortadelas, ovo líquido pasteurizado, molhos, etc.

Apesar da característica principal de toda bacteriocina ser a utilização em alimentos, por atuar como conservante natural, pesquisas recentes verificaram a grande possibilidade do uso de nisina para finalidades terapêuticas particularmente interessantes em tratamentos de úlceras estomacais e infecções de cólon intestinal para pacientes com imunodeficiência (Dubois, 1995; Sakamoto et al, 2001).

Além dos estudos da aplicação em produtos odontológicos (Turner, Love e Lyons, 2004) em produtos farmacêuticos, como no estudo da utilização em contraceptivos (Reddy, *et al.* 2004).

Nisina mostra um vasto espectro de atividade inibitória em microrganismos Gram-positivos, por isso há um grande interesse em sua utilização como conservante em alimentos (Hunter, 1999). Entretanto há resistência efetiva à bactérias Gram-negativas, isso ocorre por causa da estrutura da membrana que envolve as células, atuando como uma eficiente barreira contra soluções hidrofóbicas e macromoléculas semelhantes a nisina (Nikaido, 1996; Vaara, 1992). Estudos mostraram que a utilização da nisina em combinação com agentes quelantes (EDTA e ortofosfato trisódico) torna bactérias Gram-negativas sensíveis a nisina (Helander, vonWright e Mattila-Shanholm, 1997; Gänzle, Hertel e Hammes, 1999).

Os principais microrganismos Gram-positivos sensíveis à ação da nisina são:

- **Bacillus SSP** (*B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*).
- **Clostridium SPP** (*Cl. Bifermentans*, *Cl. Botulinum*, *Cl. butyricum*, *Cl. histolyticum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. perfringens*, *Cl. putrificum*, *Cl. sordelli*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tertium*, *Cl. thermosaccharolyticum*, *Cl. tyrobutyricum*).
- **Desulfotomaculum SPP** (*Desulfotomaculum nigrificans*).
- **Enterococcus SPP** (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*).
- **Lactobacillus SPP** (*Lactobacillus spp*, *L. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. lactis*, *L. plantarum*);
- **Leuconostoc SPP** (*L. oenos*, *L. mesenteroides*).
- **Listeria SPP** (*Listeria monocytogenes*).
- **Micrococcus SPP** (*M. luteus*, *M. varians*).
- **Pediococcus SPP** (*Pediococcus spp*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*).
- **Staphylococcus SPP** (*S. aureus*).

- ***Sporolactobacillus SPP*** (*Sporolactobacillus inulinus*)

### 3.5 Formação da Nisina

Estudos prévios mostraram que a nisina é formada continuamente desde os estágios iniciais de crescimento até a fase estacionária, além disso, um atraso da fase de crescimento rende um expressivo aumento em produção de nisina (Buchman et al., 1988; de Vuyst e Vandamme, 1992).

O lançamento de nisina da célula para o meio de propagação é dependente do pH deste ambiente. Em valores de pH menores que 6,0, mais de 80% da nisina produzida é liberada ao meio de crescimento. Enquanto a pH maiores de 6,0 a maior parte da nisina está associada à membrana celular e no interior da célula (Hurst e Kruse, 1972; Parente, Ricciardi e Addario, 1994). Por outro lado, quando as bactérias, *L. lactis* são cultivadas em pH > 6,0, a maioria da nisina é retida dentro da membrana ou intracelularmente (Hurst, 1981).

A solubilidade e a estabilidade da nisina aumentam substancialmente com aumento da acidez do meio. A nisina é estável em pH 2 e pode ser autoclavada a 121°C (Biwas et al., 1991).

### 3.6 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação principal de lantibióticos parece ligado à formação de poros na membrana bacteriana (Sahl e Bierbaum, 1998). A formação dos poros aumenta a permeabilidade de íons de maneira descontrolada, levando à perda de ATP e aminoácidos, acarretando em perda ou dissipação do potencial de membrana da bactéria. O efeito combinado de depressão de energia e fluxo de compostos essenciais compromete a síntese de macromoléculas e resulta finalmente na morte celular, acompanhada em muitos dos casos por lise celular (Ruhr e Sahl, 1985; Sahl e Brandis, 1982). O mecanismo de formar poros é reconhecidamente utilizado pela nisina, epidermina, lactocina A e B, entre outros (Hoffman et al., 2002).

Existem muitas abordagens de mecanismo de ação da nisina contra esporos e células vegetativas. **A ação da nisina contra esporos pode ser causada pela a**

afinidade da bacteriocina por grupos de resíduos de proteína com grupamento sulfidrilícos (Morris et al., 1984).

A sensibilidade de esporos a nisina varia de espécies tais como *B. sthearothermophilus* e *C. thermosaccharolyticum* sendo particularmente susceptíveis quando os esporos por ação mecânica, por exemplo, são expostos a temperaturas superiores a 60 °C, possibilitando a penetração de nisina por abrirem suas camadas externas. De maneira semelhante, esporos podem ser sensibilizados por nisina através de tratamento com EDTA (Winkowski e Monteville, 1992).

### 3.7 Estudo dos Meios de Cultivo

Muitos artigos descrevem os caldos MRS e M17 como ótimos meios de cultivo utilizados para o crescimento celular e produção de bacteriocina pelo *Lactococcus lactis* (Biswas et al., 1991; Daba et al., 1993; Reid e Macgroarty, 1988; tem Brink et al., 1994; Toba et al., 1991; Cheig et al., 2002).

As diferentes concentrações dos suplementos nutricionais tais como a sacarose, a lactose e a glicose podem estar ligadas a nisina excretadas nos meios de cultivos pelo *L. lactis* (Kim, Hall e Dunn, 1997). E altas concentrações de sacarose podem estar relacionadas ao aumento da produção de nisina no fim da fase estacionária (de Vuyst e Vandamme, 1992).

Foi verificado em trabalho anterior que a utilização do meio sintético MRS com ou sem a suplementação de sacarose, asparagina e fosfato de potássio, mostraram que crescimento celular e a produção de nisina são concomitantes e ambos indicam que o tempo de processo até o início da fase estacionária é ao redor de 36 horas (Penna e Moraes, 2002). Os autores observaram uma influência positiva dos suplementos mostrando que a produção de nisina e massa celular de *L. lactis* dependiam do balanço de sacarose e asparagina, mas era independente do fosfato de potássio.

Considerado um alimento de excepcional por seu alto valor nutritivo para o homem, o leite, contém proteínas, hidratos de carbono, ácidos graxos, sais minerais, vitaminas e água. Sendo um alimento rico em componentes nutritivos, constitui um ótimo meio de cultivo para ampla gama de microrganismos, além de sofrer alterações em curto espaço de tempo (Ponsano, 1999).

A água é o componente que participa em maior proporção na composição do leite e com exclusão dela, os demais componentes, lipídeos, lactose, caseína, sais minerais e outros, constituem a fração denominada sólidos totais desengordurados ou Extrato Seco Total (EST) do leite (Behemer, 1987).

O leite tratado em ultra-alta temperatura (UAT), conhecido como *ultra high temperature (UHT)* é natural e processado obedecendo as mais rigorosas condições tecnológicas e higiênicas. É aquecido a 140 °C, durante 5 segundos. Esse aquecimento reduz, drasticamente, qualquer possibilidade de contaminação, preservando o sabor característico. Em seguida, é rapidamente resfriado à temperatura ambiente e acondicionado diretamente em embalagem asséptica, o que impede a proliferação de microrganismos. O leite UHT, após 7 dias de incubação a 35-37° C não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento (ANVS – RDC nº 12 de 02/01/2001).

Como meio de cultivo, o leite fornece excelentes condições de crescimento para o *L. Lactis* e sua excreção de nisina no meio, pois o microrganismo fermenta a lactose contida no leite, formando o ácido láctico. Este produto faz com que o pH do meio de cultivo diminua ocasionando liberação de nisina para o meio extracelular.

Através dos resultados mostrados no trabalho de Moraes (2002) buscamos aqueles de relevância, ou seja, resultados que mostraram o maior valor de produção de nisina e adaptamos para as metodologias desenvolvidas neste trabalho, que incluíram os meios de cultivo M17 e leite desnatado.

## 4. Material e métodos

### 4.1. Equipamento

- ✓ Autoclave - Brinkman, modelo 3870E, Asselbornet, Alemanha;
- ✓ Balança analítica – Marte, modelo AL 500, São Paulo, SP - Brasil;
- ✓ Centrífuga – BRA 4i, St. Herblain, França;
- ✓ Espectrofotômetro – Beckman, modelo DU640, USA;
- ✓ Estufa bacteriológica - Fanem, modelo 347F, São Paulo, SP - Brasil;
- ✓ Fluxo laminar – Veco, modelo VLFS 12M, Campinas, SP - Brasil;
- ✓ Medidor de pH – Fisher Scientific, modelo AR 20, Hampton, NH, E.U.A.;
- ✓ Agitador rotacional *shaker* – Tecnal, modelo TE 420, Piracicaba, SP – Brasil.

### 4.3. Meios de cultura, nutrientes e soluções.

Meios de cultura sintéticos foram preparados segundo as instruções do fabricante e tem a composição apresentada nas tabelas 1 e 2:

- ✓ Caldo MRS e agar MRS (*Man Rugosa Shaper* – Difco, Sparks, Maryland, USA);
- ✓ MRS *soft-agar*: utilizou-se o caldo MRS acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico (Difco, Sparks, Maryland, USA),
- ✓ Caldo M17 (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra )
- ✓ Ágar PCA (Plate Count Agar, Difco, Sparks, Maryland, USA), utilizado para contagem celular.

Meio de cultivo natural ou leite desnatado UHT (Parmalat, São Paulo, Brasil) utilizado tem a composição apresentada nas tabelas 2 e 3.

Os nutrientes utilizados foram:

- ✓ Sacarose (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), dissolvido em água destilada na concentração  $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ ,
- ✓ Fosfato monobásico de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha): dissolvido em água destilada na concentração 18g/L,
- ✓ Asparagina (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil): dissolvido em água destilada na concentração  $75 \text{ g.L}^{-1}$ ,
- ✓ Glicerol: adicionado em concentração de 30% em relação ao caldo de cultura, para congelar as amostras das cepas utilizadas,



Solução fisiológica (0,85% NaCl): preparada em água destilada, utilizada na diluição das suspensões bacterianas durante o procedimento de semeadura em profundidade, para contagem das colônias viáveis.

Nisaplin® (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA): diluído em solução de HCl 0,02N na proporção 0,01g de Nisaplin® para cada 1,5 ml de HCl.

Todos as soluções e meios de cultivo sintéticos preparados foram submetidos a autoclavação à temperatura de 121 °C durante 15 min. O meio lácteo foi submetido à temperatura de 111 °C por 5 minutos, em autoclave

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo utilizando: caldo MRS, leite desnatado e suplementos.

Composição	g.100 mL <sup>-1</sup>	MRS				
		composição básica	MRS com suplementos	MRS com Leite	MRS com leite + suplementos	
Caldo MRS	Extrato de levedura	0,5	0,24	-	0,125	0,09
	Sulfato de magnésio	0,01	0,01	-	< 0,01	< 0,01
	Proteose Peptona	1	0,48	-	0,25	0,17
	Dextrose	2	0,96	-	0,5	0,35
	Extrato de carne	1	0,48	-	0,25	0,17
	Citrato amoníaco	0,20	0,09	-	0,05	0,04
	Fosfato dipotássico	0,20	0,09	-	0,05	0,04
	tween 80	0,10	0,05	-	0,03	0,02
	Sulfato de Manganês	0,01	0,01	-	< 0,01	< 0,01
	Acetato de Sódio	0,50	0,24	-	0,13	0,09
	Sacarose	-	0,04	-	-	0,04
	Suplementos	Fosfato dipotássico	-	0,02	-	-
Asparagina		-	0,08	-	-	0,08
Carboidratos		-	-	5	1,25	0,87
Leite desnatado	Proteínas	-	-	3	0,75	0,52
	Ferro	-	-	0,45	0,11	0,08
	Cálcio	-	-	0,2	0,05	0,04
	Colesterol	-	-	0,25	0,06	0,04
	Gorduras Totais	-	-	0,01	< 0,01	< 0,01
	Gorduras Saturadas	-	-	0,12	0,03	0,02
	Sódio	-	-	0,05	0,01	0,01
	Vitamina A	-	-	0,01	< 0,01	< 0,01
	Vitamina D	-	-	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	Sólidos totais	g.100mL <sup>-1</sup>	5,5	2,79	9,09	3,65

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo utilizando: caldo M17, leite desnatado e suplementos

Composição	g.100ml <sup>-1</sup>	M17 composição básica	M17 com suplementos	M17 com sacarose	Leite	M17 com leite	M17 com leite + suplementos	M17 com leite + sacarose
Caldo M17	Triptona	0,53	0,26	0,26	-	0,13	0,09	0,09
	Extrato levedura	0,26	0,13	0,13	-	0,07	0,05	0,05
	Sulfato de Mg	0,03	0,01	0,01	-	0,01	0,01	0,01
	Proteína Soja	0,53	0,26	0,26	-	0,13	0,09	0,09
	Digerido de Carne	0,53	0,26	0,26	-	0,13	0,09	0,09
	Ácido Ascórbico	0,05	0,03	0,03	-	0,01	0,01	0,01
	Glicerolfosfato dissódico	2	0,96	0,96	-	0,5	0,35	0,35
	Sacarose	-	0,04	0,14	12,5	-	0,04	0,14
	Fosfato dipotássio	-	0,02	-	-	-	0,02	-
	Asparagina	-	0,08	-	-	-	0,08	-
Leite desnatado	Carboidratos	-	-	-	5	1,25	0,87	0,87
	Proteínas	-	-	-	3	0,75	0,52	0,52
	Ferro	-	-	-	0,45	0,11	0,08	0,08
	Cálcio	-	-	-	0,2	0,05	0,04	0,04
	Colesterol	-	-	-	0,25	0,06	0,04	0,04
	Gorduras Totais	-	-	-	0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Gorduras	-	-	-	0,12	0,03	0,02	0,02
	Saturadas	-	-	-	0,05	0,01	0,01	0,01
	Sódio	-	-	-	0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Vitamina A	-	-	-	-	-	-	-
Sólidos totais	Vitamina D	-	-	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	g.100mL <sup>-1</sup>	3,93	2,02	2,04	16,43	3,25	2,39	2,40

#### 4.4. Cepas bacterianas

A cepa de *Lactococcus lactis* ATCC 11454, bactéria produtora de nisina, e a cepa de *Lactobacillus sake* ATCC 9221, bactéria sensível à ação da nisina, foram mantidas à -80°C em caldo MRS adicionado de 40% de glicerol.

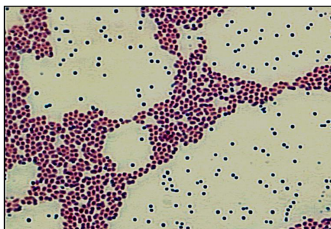


Figura 2. *Lactococcus lactis* ATCC 11454.



Figura 3. *Lactobacillus sake* ATCC 15521.

Os ensaios de crescimento e produção de nisina foram realizados a partir do preparo de pré-inóculos em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo, para onde foram transferidos 100 µL da cepa congelada de *L. lactis*. Os meios inoculados foram incubados a 30°C por 36 horas em agitador rotacional a 100 rpm. Dos pré-inóculos, alíquotas de 5 mL foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios de cultivo, descritos nas tabelas 2 e 3. Esta transferência foi realizada através de cinco repiques consecutivos.

Após período de 36 horas de incubação, foram analisados os parâmetros de crescimento e atividade de nisina formada na suspensão bacteriana.

#### 4.5 Determinação do valor de pH.

As medidas de valor de pH foram realizadas em pHâmetro, previamente calibrado com soluções tampão pH 7,0 e 4,0. Alíquota de 5 mL ( $\pm 1$ ) do cultivo foi transferida para béquer de 25 mL, no qual foi imerso o eletrodo do pHâmetro. Após a estabilização do equipamento, houve o registro do valor de pH.

#### 4.6 Determinação Concentração Celular

A determinação da concentração celular foi obtida através dos seguintes métodos: (i) por leitura da densidade óptica ( $DO_{660nm}$ ) em cubetas de quartzo de caminho óptico 1 cm, ajustada em espectrofotômetro, ao comprimento de onda de 660 nm; (ii) por determinação da massa seca (*dry cell weight* ou DCW), que foi realizada em alíquota de 5 mL do cultivo de *L. lactis*, filtrada através de membrana com porosidade de 0,45  $\mu m$  (Millipore, SP, SP), sendo submetida à secagem em estufa à 100 °C por 24 horas, e à pesagem em balança analítica; (iii) por contagens das unidades formadoras de colônias por mililitro da suspensão bacteriana derivada do cultivo (UFC/mL); que foram realizadas através de diluições seriadas da suspensão bacteriana em solução fisiológica, cada diluição foi submetida à semeadura de profundidade em placa de Petri (ágar PCA), cada placa foi incubada a 30 °C durante 24 horas. Sendo contadas, após este período, as placas contendo entre 30 a 300 colônias visíveis.

O desenvolvimento celular foi representado através de curva de referência associando  $DO_{660nm}$  à massa seca da mesma suspensão, representada pela equação:

Equação 1:  $y = (x - 0.0145/0.0022)$ ; em que  $y = DCW (mg.L^{-1})$  e  $x = DO (660 nm)$ .

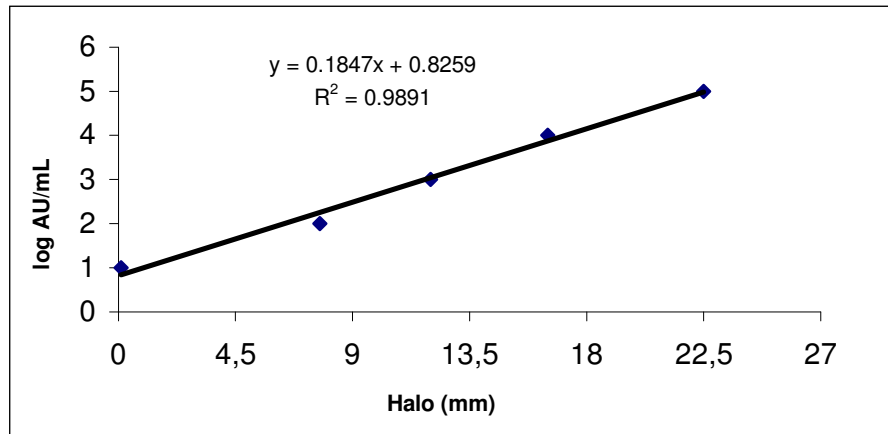
#### 4.7. Determinação da Atividade de Nisina

A cepa do *Lactobacillus sake* foi utilizada como célula sensível para determinação da atividade de nisina, através do método de difusão em ágar (Vessoni Penna e Moraes, 2002). *L. sake* foi inoculado em caldo MRS e incubado a 30 °C em 100rpm. Após 24 h, alíquota de 5mL foi retirada para leitura de  $DO_{660nm}$ . Ao  $DO_{660nm} = 0,4$ , transferiu-se uma alíquota de 1,5 mL dessa suspensão para 250 mL de MRS *soft-agar*. Após a solidificação do meio inoculado na placa de Petri, foram feitos orifícios de aproximadamente 3mm de diâmetro na superfície do ágar. Alíquotas de 1,0 mL do cultivo de *L. lactis*, a 30°C por 36 h em 100rpm, foram transferidas para tubos de 2,0 mL e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min, para garantir que somente a nisina excretada no meio fosse avaliada. Alíquotas de 50µL do sobrenadante foram transferidas para os orifícios. As placas foram incubadas a 30° C. Após 24 h os diâmetros dos halos formados (por inibição de crescimento celular) foram medidos (quatro medidas com paquímetro). A medida média dos halos foi relacionada às atividades de nisina, e estas foram expressas em unidades arbitrárias (arbitrary units - AU). A partir da solução padrão de nisina, NISAPLIN<sup>®</sup>, as unidades arbitrárias foram convertidas em concentração de nisina (Nisaplin, contém 25 mg nisina / g do produto (2,5%), correspondendo em  $10^6$  AU), foram realizados três ensaios distintos, com nisina dissolvida em solução de HCl 0,02 N e em leite desnatado (aos valores de pH 6,8 e ajustado em pH 2,5), este ajuste de pH para 2,5 foi realizado para a certificação de que a nisina permaneceria no sobrenadante após a centrifugação, por precipitação do leite devido ao valor de pH. Alguns trabalhos citam que o ajuste de pH utilizando HCl previne a adsorção da bacteriocina pelas superfície das células produtoras(.....)[D2]

As curvas padrão foram obtidas através da relação entre a medida de diâmetro de halo de inibição e solução padrão de nisina, diluída entre os valores de  $10^1 - 10^5$  AU.mL<sup>-1</sup>, tal relação permitiu o delineamento dos gráficos (figuras 4.1, 4.2 e 4.3) e equações apresentadas a seguir:

Solução de nisina em HCl 0,02 N, pH 3,0:

$$\text{Equação 2: AU. mL}^{-1} = 10^{((0,1847 \times (\text{halo, mm})) + 0,8259)},$$

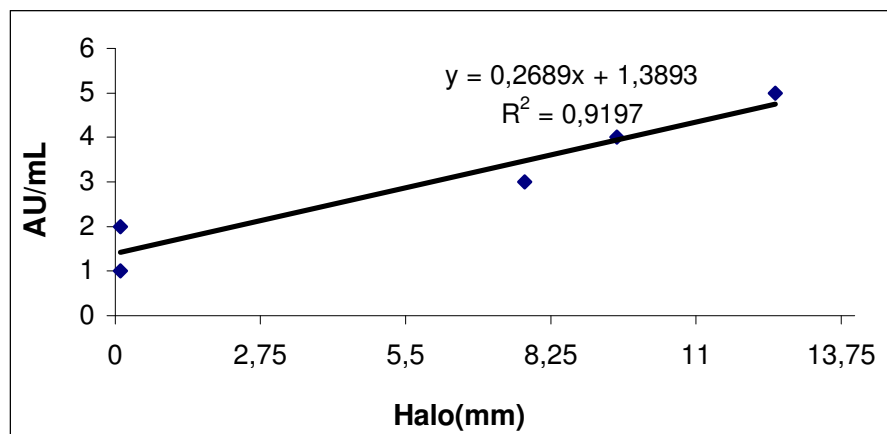


desvio padrão SD=±0,4-0,5

Figura 4.1 Relação entre o diâmetro do halo de inibição e atividade de nisina. Curva padrão obtida a partir da nisina dissolvida em HCl 0,02 N

Solução nisina em leite desnatado, pH = 6,8:

$$\text{Equação 3: AU. mL}^{-1} = 10^{((0,2689 \times (\text{halo, mm})) + 1,3893)}$$

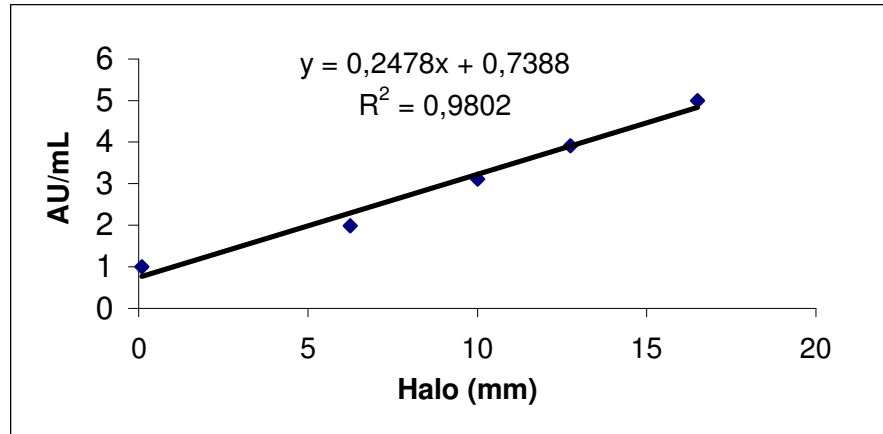


desvio padrão SD=±0,4-0,5

Figura 4.2. Relação entre o diâmetro do halo de inibição e atividade de nisina. Curva padrão obtida a partir da nisina dissolvida em leite pH 6,8.

Solução nisina em leite desnatado, pH = 2,5:

$$\text{Equação 4: AU. mL}^{-1} = 10^{((0,2478 \times (\text{halo, mm}) + 0,7388)}$$



desvio padrão SD=±0,4-0,5

Figura 4.3. Relação entre o diâmetro do halo de inibição e atividade de nisina. Curva padrão obtida a partir da nisina dissolvida em leite pH 2,5.

As unidades arbitrárias (AU) foram convertidas em concentração de nisina ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), através da equação

Equação 5: Nisina ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) = ( $z \cdot 0,025$ ); em que  $z = \text{AU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 0,025 = fator de conversão da solução padrão, correspondente a 2,5% de nisina em 25g do produto comercial Nisaplin®.

#### 4.8 Determinação da produção específica e produtividade

A formação de nisina relacionada à massa celular (DCW) e ao tempo de cultivo mostra os valores de produção específica e produtividade do cultivo.

A produção específica foi expressa em  $\text{mg}_{\text{nisina}} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{DCW}}$ , onde foi relacionada à formação de nisina em  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  à concentração celular ( $\text{mg}_{\text{DCW}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ou expressa em  $\text{mg}_{\text{nisina}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ .

A produtividade foi expressa em  $\text{mg}_{\text{nisina}} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$  e representou a produção de nisina ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) associada à concentração celular ( $\text{mg}_{\text{DCW}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) pelo período do cultivo em horas (h), ou expressa em  $\text{mg}_{\text{nisina}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ .



#### **4.9 Ensaios em meio sintético para produção de Nisina.**

Os ensaios (30 °C/100 rpm/36 horas) em meio sintético foram realizados a partir de diferentes formulações, desenvolvidas a partir dos caldos MRS e M17, contendo:

1. Caldo MRS na concentração padrão, conforme recomendação do fabricante;
2. Caldo M17 na concentração padrão, conforme recomendação do fabricante;
3. Caldo MRS na metade da concentração padrão (item 1), diluído em água Milli Q estéril, acrescentado com 0,13% de suplementos (0,035% sacarose, 0,018% fosfato de potássio e 0,075% asparagina);
4. Caldo M17 na metade da concentração padrão (item 2), diluído em água Milli Q estéril, acrescentado com 0,13% de suplementos (0,035% sacarose, 0,018% fosfato de potássio e 0,075% asparagina);
5. Caldo M17 na metade da concentração padrão (item 2), diluído em água Milli Q estéril, suplementado com 0,14 % sacarose;
6. Caldo M17, na concentração padrão, suplementado com 12,5% sacarose.

#### **4.10 Ensaio em Meio natural lácteo para a produção de nisina.**

Os ensaios (30 °C/100 rpm/36 horas) em meio natural lácteo foram realizados a partir de diferentes formulações, desenvolvidas a partir do leite desnatado, contendo:

1. Leite desnatado na concentração do fabricante, segundo rótulo da embalagem;
2. Leite desnatado homogeneizado com caldo MRS ou M17, resultando em uma concentração final de nutrientes de 25% MRS + 25% leite; e 25% M17 + 25% leite;
3. Leite desnatado homogeneizado com caldo MRS ou M17 e 0,13% de suplementos (0,035% sacarose, 0,018% fosfato de potássio e 0,075% asparagina), resultando em uma concentração final de nutrientes de 17.36% MRS + 17.36% leite; e 17.36% M17 + 17.36% leite;
4. Leite desnatado homogeneizado com caldo M17 e 0.14% sacarose, resultando em uma concentração final de nutrientes de 17.86% M17 + 17.86% leite.

## 5. Resultados e discussão

A produção de nisina foi estudada através da transferência de alíquotas do cultivo de *L. lactis*, por cinco vezes consecutivas, em intervalos de 36 horas, para o mesmo meio de cultivo, para as mesmas condições de incubação (30 °C/100rpm). A atividade de nisina, a produção específica, a relação entre a atividade de nisina e a massa celular, referentes aos cultivos, estão apresentadas nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

### 5.1 Resultados da Produção de Nisina nos Meios Sintéticos

Os resultados obtidos do cultivo de *L. lactis* (30 °C/36h/100rpm) em meios sintéticos, MRS e M17, com ou sem a suplementação de nutrientes e com ou sem o ajuste do valor de pH final do cultivo, estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

Para os cultivos de *L. lactis* em meios sintéticos preparados segundo instruções do fabricante (100% MRS e 100% M17), sem suplementação de nutrientes (Tabela 3) a formação de halo inibitório do crescimento de *L. sake* não foi constatada, pois a expressão de nisina, se presente, não foi suficiente para inibir o crescimento dessa cepa bacteriana.

Porém, para valores de pH final do cultivo em 100% MRS, ajustado para 2,5 (Tabela 4, figura 5.1), a presença da atividade da nisina foi confirmada, na 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> transferências, sendo o logaritmo ( $\text{Log}_{10}\text{AU}$ ) das unidades arbitrárias 1,9 – 2,7 e apresentando uma variação na concentração de nisina entre 2,15 e 13,1  $\text{mg.L}^{-1}$ , o que mostrou a produtividade do processo inferior a 0,01  $\text{mg.g}^{-1}_{\text{DCW.h}^{-1}}$ .

Estes dados mostram que o ajuste do valor de pH para 2,5 no meio favoreceu a passagem de nisina pela superfície da membrana celular para o meio de cultivo, permitindo a detecção de ínfima atividade da bacteriocina.

Nos cultivos em 100% M17, suplementado com 12,5% sacarose (tabela 3), a formação de halos inibitórios foi observada nas 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> transferências, para a máxima atividade de nisina em  $\text{Log}_{10}$  de 4,1 (285,82  $\text{mg.L}^{-1}$ ) relacionado a 5<sup>a</sup> transferência. O ajuste do valor de pH =2,5 aumentou 2 vezes o diâmetro dos halos inibitórios, se comparados aos halos detectados na suspensão bacteriana sem ajuste de pH, referente a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> transferências; e não interferiu na detecção da atividade de nisina referente a 5<sup>a</sup> transferência.

A composição do meio diluída para 50% M17 da formulação original (recomendada pelo fabricante), suplementada de 0,14% sacarose, favoreceu a formação de halos inibitórios que apresentaram um aumento de 9,3 vezes da 1ª a 5ª transferência, correspondendo as concentrações de nisina, entre 16,19 e 151,02 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 3, figura 5.1). Máxima atividade de nisina em potência logarítmica (3,9) foi constatada na 4ª transferência, correspondendo à concentração de nisina em 186,81 mg.L<sup>-1</sup>. Em relação à produção específica de nisina, observou-se incremento de 12 vezes, de 0,04 a 0,48 mg.mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub>, respectivamente da 1ª a 4ª transferência. O ajuste de pH final para 2,5 (Tabela 4, figura 5.1), não favoreceu a liberação de nisina pelas células.

As atividades de nisina aumentaram gradualmente em relação aos períodos de cultivo, confirmando a importância da técnica de transferência para a adaptação e desenvolvimento celular e paralela produção de nisina, que é expressa em maior concentração na fase exponencial do microrganismo, onde dispõe da maior concentração de fonte de carbono e de nutrientes presentes no meio de cultivo.

A renovação constante do meio de cultivo disponibiliza, às células bacterianas, fonte nutritiva permanente e em excesso, que favorece a fase exponencial de crescimento, a constante produção e liberação de nisina.

A redução para metade da concentração do M17 e para 100 vezes menor a concentração de sacarose, contribuiu na formação e expressão de nisina pelas células, que pudesse estar reprimida por excesso de nutrientes presentes no meio de 100% M17, preparado segundo as indicações do fabricante.

A utilização de 12,5% de sacarose em meio M17 favoreceu a detecção de nisina sem ajuste do valor de pH final para 2,5 (que dificultou a detecção da atividade de nisina no meio de cultivo). Verificou-se em trabalho preliminar (Moraes, 2002), que a sacarose 12,5% favorece a produção celular de nisina na fase logarítmica de crescimento após a adaptação da cepa ao meio de cultivo.

Tabela 3. Atividade de Nisina, produção específica e produtividade nas transferências do cultivo de *L. lactis* ATCC 11454, a cada 36h (30° C, 100 rpm), para meio sintético MRS ou M17.

Meios de cultivo Composição	Pré cultivo	Transf.	pH	Halo mm	Atividade AU.mL <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> AU	Nisina mg.L <sup>-1</sup>	Produção	
								específica mg <sub>nisina</sub> .mg <sup>-1</sup> <sub>DCW</sub>	Produtividade mg <sub>nisina</sub> .mg <sup>-1</sup> <sub>DCW</sub> .h <sup>-1</sup>
100% MRS (pH=6,5)	MRS	1	6,20	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	6,15	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	5,65	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	5,33	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		5	5,12	<0,1	<0,1	-	-	-	-
100%M17 (pH=6,9)	M17	1	7,10	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	7,30	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	6,80	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	7,00	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		5	7,20	<0,1	<0,1	-	-	-	-
50%MRS + 0,13% suplementos (pH=6,13)	MRS	1	5,90	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	4,70	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	4,90	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	4,70	12,75	1516,44	3,18	37,91	0,10	<0,01
		5	4,80	17,00	9242,72	3,97	231,07	0,62	0,02
50%M17 + 0,13% suplementos (pH=6,28)	M17	1	6,00	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	6,00	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	6,10	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	6,10	16,50	7472,23	3,87	186,81	0,48	0,01
		5	6,30	<0,1	<0,1	-	-	-	-
50%M17 + 0,14% sacarose (pH=6,94)	M17	1	5,50	10,75	647,78	2,81	16,19	0,04	<0,01
		2	5,60	12,00	1102,30	3,04	27,56	0,06	<0,01
		3	5,70	11,25	801,26	2,90	20,03	0,05	<0,01
		4	5,90	16,50	7472,23	3,87	186,81	0,48	0,01
		5	6,00	16,00	6040,88	3,78	151,02	0,41	0,01
100%M17 + 12,5% sacarose (pH=6,27)	M17	1	4,50	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	4,50	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	4,50	8,25	223,70	2,35	5,59	0,01	<0,01
		4	4,50	8,25	223,70	2,35	5,59	0,01	<0,01
		5	4,40	17,50	11432,73	4,06	285,82	0,77	0,02

**Unidades Arbitrárias por litro:**  $AU.mL^{-1} = 10^{(0.1847 * H + 0.8259)}$ , em que H, mm = diâmetro do Halo em milímetros; Desvio Padrão (SD = 0.4 – 0.5). **Concentração nisina:**  $mg.L^{-1} = (x) * 0.025 / 1000$ , em que x = Atividade (AU.L<sup>-1</sup>), e 0.025 é o fator de conversão da solução de nisina padrão (0.025 = 2,5% de nisina, conforme instruções da embalagem do produto). **Produção Específica** = (x) / (DCW), em que x = Concentração de Nisina (mg.L<sup>-1</sup>), e DCW = massa seca celular (mg.L<sup>-1</sup>) = (mg<sub>nisina</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub>). **Produtividade:**  $mg.mg^{-1}DCW.h^{-1} = (x) / 36$ , em que x = Produção específica mg<sub>nisina</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub>

Tabela 4. Atividade de Nisina, produção específica e produtividade nas transferências do cultivo de *L. lactis* ATCC 11454, a cada 36h (30° C, 100 rpm), para meio sintético MRS ou M17), com pH ajustado para 2.5.

Meios de cultivo Composição	Pré cultivo	Transferência	Halo (mm)	Atividade (AU.mL <sup>-1</sup> )	Log <sub>10</sub> AU	Nisina (mg.L <sup>-1</sup> )	Produção específica mg.DCWmg <sup>-1</sup>	Produtividade mg.DCWmg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
100% MRS (pH=6,5)	MRS	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	6	86,00	1,93	2,15	0,01	< 0,01
		4	8	201,00	2,30	5,03	0,01	< 0,01
		5	10,3	524,00	2,72	13,10	0,03	< 0,01
100%M17 (pH=6.9)	M17	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	-	-	-
50%MRS + 0.13% suplementos (pH=6.13)	MRS	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	8,75	276,71	2,44	6,92	0,02	< 0,01
		4	10	470,87	2,67	11,77	0,03	< 0,01
		5	15,8	5431,57	3,73	135,79	0,37	0,01
50%M17 + 0.13% suplementos (pH=6.28)	M17	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-
		4	14,3	2869,95	3,46	71,75	0,18	0,01
		5	11,3	801,26	2,90	20,03	0,05	< 0,01
50%M17 + 0.14% sacarose (pH=6.94)	M17	1	-	-	-	-	-	-
		2	12	1102,30	3,04	27,56	0,06	< 0,01
		3	-	-	-	-	-	-
		4	15,5	4883,71	3,69	122,09	0,3	0,01
		5	12,5	1363,48	3,13	34,09	0,09	< 0,01
100%M17 + 12.5% sacarose (pH=6.27)	M17	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	13,3	1875,75	3,273	46,89	0,13	< 0,01
		4	13,3	1875,75	3,273	46,89	0,12	< 0,01
		5	16,3	6718,54	3,827	167,96	0,45	0,01

**Unidades Arbitrárias por litro:**  $AU.mL^{-1} = 10^{(0.1847 * H + 0.8259)}$ , em que H, mm = diâmetro do Halo em milímetros; Desvio Padrão (SD = 0.4 – 0.5). **Concentração nisina:**  $mg.L^{-1} = (x) * 0.025 / 1000$ , em que x = Atividade (AU.L<sup>-1</sup>), e 0.025 é o fator de conversão da solução de nisina padrão (0.025 = 2,5% de nisina, conforme instruções da embalagem do produto). **Produção Específica** = (x) / (DCW), em que x = Concentração de Nisina (mg.L<sup>-1</sup>), e DCW = massa seca celular (mg.L<sup>-1</sup>) = (mg<sub>nisina</sub> · mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub>). **Produtividade:**  $mg.mg^{-1}_{DCW}.h^{-1} = (x) / 36$ , em que x = Produção específica  $mg_{nisina}.mg^{-1}_{DCW}$

Nos ensaios utilizando 50% MRS + 0,13% de suplementos (sacarose, fosfato de potássio e asparagina) as atividades de nisina, 1516 - 9242 AU.mL<sup>-1</sup>, correspondendo às concentrações de nisina 37,91 e 231,07 mg.L<sup>-1</sup>, foram observadas, respectivamente, para a 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> transferências (Tabela 3, figura 5).

O valor de atividade obtido na 5<sup>a</sup> transferência foi próximo àquele obtido na 4<sup>a</sup> transferência nos cultivos de *L. lactis* em 50% M17 + 0,13% de suplementos e 50% M17 + 0,14% de sacarose; e àquele obtido na 5<sup>a</sup> transferência do cultivo em 100% M17+ 12.5% sacarose, confirmando que a suplementação dos meios contribuiu na formação de nisina e que o excesso de nutrientes nos meios sintéticos, preparados conforme o fabricante (100%) pode vir a acelerar o crescimento celular em detrimento da formação de nisina.

Estas mesmas condições de cultivo (50% MRS + 0,13% de suplementos), o ajuste do valor de pH final do meio para 2,5, favoreceu a formação de halos de inibição e a atividade de nisina foi possível ser avaliada nas 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> transferências, quando a atividade, variou de 276,71 AU.mL<sup>-1</sup> para 5431,57 AU.mL<sup>-1</sup> (Tabela 4, Figura 5.1).

Estes valores demonstram, assim como no ensaio com 100% MRS, o ajuste do pH evidenciou detecção nisina, mas não potencializou os valores de atividade.

Nos ensaios utilizando 50% M17 + 0,13% suplementos a atividade de nisina foi detectada somente na 4<sup>a</sup> (Tabela 3, figura 5), e correspondeu ao valor de 7472,23 AU.mL<sup>-1</sup>, e a produção de 186,80 mg. L<sup>-1</sup>. A produção específica foi de 0,48 mg<sub>nisina</sub>. mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub> e a produtividade 0,01 mg<sub>nisina</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub>. h<sup>-1</sup>. Estes valores mostraram que a presença do fosfato de potássio e da asparagina interferem de forma negativa na produção de nisina pela célula, visto que na concentração de 50% M17 apenas com sacarose, como fonte de carbono extra, houve detecção da atividade da nisina nas análises finais de cada transferência.

Ajustando o pH final do meio para 2,5, a presença de atividade da nisina, conforme mostra a figura 5.1, foi detectada na quarta e quinta transferência, 71,75 e 20,03 mg. L<sup>-1</sup>, respectivamente. As produções específicas de nisina em mg<sub>nisina</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub>, corresponderam aos seguintes valores 0,18 e 0,05. Tais valores reforçam que o ajuste final do pH em 2,5 não potencializa a atividade (Tabela 4).

Os meios contendo 50% M17 com 0,14% de sacarose e 100% M17 com 12.5% de sacarose forneceram melhores condições de crescimento para o

*Lactococcus lactis* e simultânea produção de nisina. Portanto, confirma-se que a produção de nisina está estreitamente relacionada a quantidade de nutrientes disponíveis no meio de cultivo e ao número de transferências celular. Cheigh et al (2002) também demonstraram a influência dos fatores nutricionais, componentes do meio de cultivo, e parâmetros de crescimento na produção de nisina durante o período logarítmico de crescimento de cepa de *L. lactis* A164.

X. Liu et al (2003) citam, em seu estudo, que os fatores nutricionais limitantes à produção de nisina por *L. lactis* incluem fonte de carbono, nitrogênio, assim como os parâmetros de crescimento, o valor de o pH inicial e final do meio de cultivo, a temperatura e a aeração do meio de cultivo.

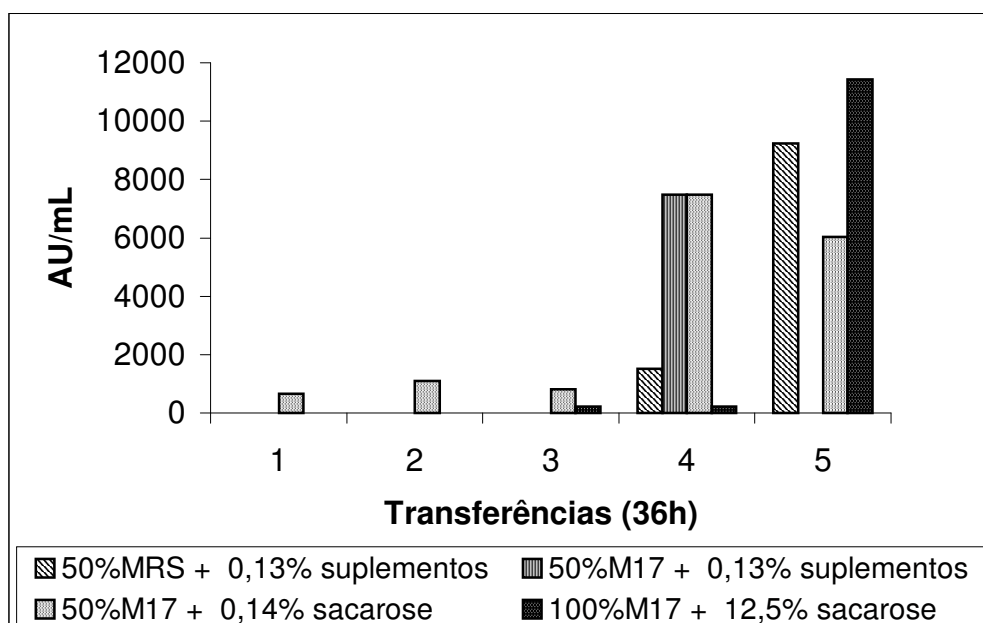


Figura 5. Atividade da nisina em AU/mL através das transferências nos ensaios utilizando meio de cultivo sintético.



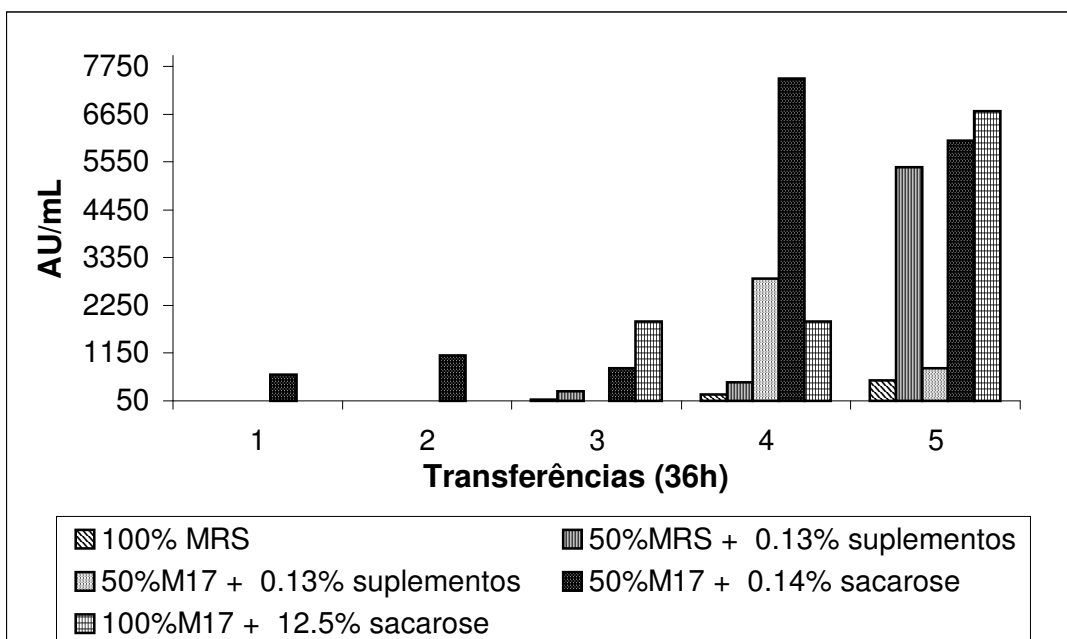


Figura 5.1. Atividade da nisina em AU/mL através das transferências nos ensaios utilizando meio de cultivo sintético em pH final ajustado para 2.5.

## 5.2 Produção de Nisina em Meio Misto e Natural

Foi avaliada a influência da composição do leite desnatado (9,09% sólidos totais), também denominado meio natural, adicionado aos meios sintéticos (MRS e M17), no desenvolvimento de *L. lactis* e a simultânea produção de nisina.

Os ensaios utilizando leite desnatado como meio de cultivo foram denominados de 100% leite 1 e 2, correspondentes ao pré-cultivo em caldo MRS e M17, respectivamente; (Tabelas 5 e 6).

No ensaio Leite 1 houve a rápida adaptação celular no meio natural indicada através do pico de atividade detectada na 3ª transferência (35389,55 AU.mL<sup>-1</sup>), correspondendo à concentração de 884,74 mg.L<sup>-1</sup>, valor 9 vezes superior ao da atividade detectada na 1ª transferência deste ensaio (Tabela 5, figura 5.2). Os valores de produção específica e produtividade foram 2,37 mg<sub>nisina</sub>. mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub> e 0,07 mg<sub>nisina</sub>. mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub>. h<sup>-1</sup>, respectivamente.

O ajuste do valor de pH final do cultivo de leite 1 para 2,5 reduziu em 3 vezes a atividade da nisina (12136,68 AU.mL<sup>-1</sup>) em relação a 3ª transferência, confirmando os resultados obtidos para os ensaios realizados em meios sintéticos (Tabelas 3 e 4).

Utilizando como pré-cultivo o meio de cultura M17, ensaio Leite 2, a formação de nisina iniciou-se a partir da 2ª transferência, sendo o pico de atividade, detectado, na 4ª transferência (25967,19 AU.mL<sup>-1</sup>), correspondendo a concentração de 649,18 mg<sub>nisina</sub>.L<sup>-1</sup>. Neste ensaio a adaptação celular foi tardia em comparação ao ensaio Leite 1, a atividade detectada na 3ª transferência foi 4.7 vezes menor se comparada a mesma transferência do ensaio anterior.

Estes resultados indicam a estreita ligação entre os constituintes dos meios de cultivo sintéticos com a promoção da produção de nisina, pois o pré-cultivo realizado em caldo MRS (Leite 1) favoreceu as células de *L. lactis*, potencializando a formação da bacteriocina.

O ajuste do valor de pH final para 2.5 no cultivo leite 2, não favoreceu a detecção da atividade de nisina atenuando os valores em 3.2 vezes em relação àqueles obtidos para o mesmo meio sem o ajuste do valor de pH, confirmando a influencia negativa do valor de pH 2.5 na avaliação da atividade de nisina.

Formulações de meio de cultivo compostos de leite desnatado e caldos MRS ou M17 foram preparadas para serem utilizadas no cultivo do *L. lactis* e verificar a influência destas associações na atividade de nisina expressa pelas células.

O meio de cultivo formulado na proporção 1:1 de caldo M17 e leite desnatado favoreceu a constituição gradual de nisina através das cinco transferências do cultivo celular. O valor máximo de atividade detectada ( $142527.94 \text{ AU.mL}^{-1}$ ) foi obtido na 5ª transferência, correspondendo à produção específica de  $9,60 \text{ mg}_{\text{nisina}} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{DCW}}$  e à produtividade de  $0,27 \text{ mg}_{\text{nisina}} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ , valores 9 vezes maiores em relação aos obtidos na 1ª transferência.

Os resultados apresentados (Tabela 5, figura 5.2) em relação a este ensaio mostram que houve a adaptação celular ao meio de cultivo permitindo a simultânea expressão da bacteriocina, conseqüentemente promovida pela influência positiva da associação dos meios e da redução dos nutrientes para 25% de leite desnatado com 25% de caldo M17 .

O ajuste do valor de pH final para 2,5 do meio de cultivo não favoreceu a detecção da atividade da nisina e confirmou os resultados anteriormente obtidos (Tabela 6, figura 5.3).

O meio de cultivo formulado na proporção 1:1 de caldo MRS e leite desnatado (Tabela 5, figura 5.2) promoveu a formação de nisina desde a 1ª transferência, semelhante ao ensaio anterior (M17 + leite), porém devido a acelerada adaptação celular o pico de atividade foi detectado na 2ª transferência ( $142527.94 \text{ AU.mL}^{-1}$ ), valor análogo ao detectado na 5ª transferência do meio constituído de caldo M17 e leite desnatado (1:1).

Estes resultados mostram a influência positiva da associação dos meios e da redução dos nutrientes para 25% de leite desnatado com 25% de caldo MRS, como na afirmativa realizada acima para o meio de cultivo composto por M17.

O ajuste do valor de pH final para 2,5 do meio de cultivo não favoreceu a detecção da atividade da nisina e confirmou os resultados anteriormente obtidos (Tabela 6, figura 5.3).

Comparando os resultados de ambos os ensaios (25% M17 + 25% leite e 25% MRS + 25% leite) pode-se afirmar que o meio de cultivo composto de caldo MRS e leite propiciou, às células, melhores condições de adaptação e conseqüentemente a instantânea formação de nisina.

A formulação do meio com 17,36% caldo MRS, 17,36% leite desnatado e 0,13% de suplementos (sacarose, fosfato de potássio e asparagina) proporcionou a detecção da atividade de nisina ( $6447 \text{ AU.mL}^{-1}$ ) apenas na 4ª e 5ª transferências, correspondendo à concentração de nisina de  $161,19 \text{ mg.L}^{-1}$ . Estes resultados mostram que a redução em 82,6% dos nutrientes totais dos meios interferiu na expressão da bacteriocina, resultando em uma baixa produtividade de nisina, 23 vezes menor em relação àquela obtida no meio formulado com 25% MRS + 25% Leite (Tabela 5, figura 5.2).

O ajuste do valor de pH final para 2,5 do meio de cultivo não favoreceu a detecção da atividade da nisina e confirmou os resultados anteriormente obtidos (Tabela 6, figura 5.3).

O meio de cultivo composto por 17,36% caldo M17, 17,36% leite desnatado e 0,13% de suplementos (sacarose, fosfato de potássio e asparagina) promoveu a expressão de nisina na 4ª e 5ª transferências do cultivo celular, comportamento similar ao meio contendo o mesmo percentual de redução nutricional (82,6%) composto por 17,36% MRS e 17,36% leite desnatado. Porém as atividades de nisina detectadas na 4ª e 5ª transferências foram de  $861,94$  e  $2547,12 \text{ AU.mL}^{-1}$  respectivamente, valores menores aos detectados no meio utilizando caldo MRS (Tabela 5, figura 5.2).

A utilização de caldo M17 e suplementos (sacarose, asparagina e fosfato) interferiu negativamente na expressão da bacteriocina, uma vez que a mesma redução nutricional utilizando caldo MRS nas mesmas condições de preparo proporcionou valores até 8 vezes maiores em relação a atividade, mesmo apresentando um comportamento semelhante ao período de expressão da nisina pelas células.

O ajuste do valor de pH final para 2,5 do meio de cultivo aumentou em 11 vezes a detecção da atividade de nisina ( $28562,75 \text{ AU.mL}^{-1}$ ) referente a 5ª transferência (Tabela 6, figura 5.3).

O meio de cultivo formulado na concentração de 17,86% caldo M17, 17,86% leite desnatado e 0,14% de sacarose favoreceu a atividade de nisina na 4ª e 5ª transferências, comportamento celular análogo ao meio de cultivo contendo 17,36% MRS + 17,36% leite desnatado + 0,13% suplementos, pois ao observar os valores das atividades na 4ª e 5ª transferência ( $8787,19$  e  $7527,05 \text{ AU.mL}^{-1}$ ),

correspondentes a produção de 219,68 e 188,18 mg<sub>nisina</sub>.L<sup>-1</sup> mostrados na Tabela 5, figura 5.2, e comparar o comportamento, ambos superaram os valores mostrados no ensaio composto por caldo M17, leite desnatado e suplementos.

A produção específica obtida no meio 17,86% M17+ 17,86% leite + 0,14% sacarose foi 10 vezes maior em relação àquela obtida no meio com 17,36% M17 + 17,36% leite + 0,13% suplementos (sacarose, fosfato de potássio, asparagina) (Tabela 5, figura 5.2), enfatizando a importância da sacarose no meio de cultivo para a expressão da nisina pelas células (Moraes, 2002). O ajuste do valor de pH final para 2,5 do meio de cultivo aumentou em 1,4 vezes a atividade de nisina (12136,48 AU.mL<sup>-1</sup>) na 4<sup>a</sup> transferência celular. (Tabela 6, figura 5.3).

Entre todos os ensaios utilizando leite desnatado, os que mostraram o melhor desempenho em relação a adaptação celular e produção de nisina foram aqueles que utilizaram os meios de cultivo MRS ou M17, em proporções 1:1, sem a adição de suplementos.

Os equilíbrios entre as concentrações nutricionais nesta proporção forneceram a quantidade exata de carboidratos e proteínas necessárias à expressão de nisina pelas células, sem a necessidade de suplementação.

X. Liu *et al* (2003) mostraram que os meios MRS e M17 são os mais apropriados para a produção de nisina, quando suplementados com glicose e lactose, respectivamente. Os autores verificaram, também, que a formação da nisina celular está diretamente relacionada às concentrações de nutrientes no meio de cultivo.

Tabela 5. Atividade de Nisina, produção específica e produtividade nas transferências do cultivo de *L. lactis* ATCC 11454, a cada 36h (30° C, 100 rpm), para meio misto e ou natural (leite desnatado).

Meios de cultivo Composição	Pré cultivo	Transf.	pH	Halo mm	Atividade AU.mL <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> AU	Nisina mg.L <sup>-1</sup>	Produção	
								específica mg <sub>nisina</sub> .mg <sup>-1</sup> <sub>DCW</sub>	Produtividade mg <sub>nisina</sub> .mg <sup>-1</sup> <sub>DCW</sub> .h <sup>-1</sup>
100% Leite 1 (pH=6,80)	MRS	1	5,1	8,25	4053	3.6	101.31	0.27	0.01
		2	4,2	10,5	16321.12	4.2	408.03	0.94	0.03
		3	4,3	11,75	35389.55	4.5	884.74	2.37	0.07
		4	4,7	11	22243.34	4.3	556.08	1.43	0.04
		5	4,8	10,5	16321.12	4.2	408.03	1.10	0.03
100% Leite 2 (pH=6,82)	M17	1	5,5	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	4,8	8,25	4052.52	3.6	101.31	0.41	0.01
		3	4,9	9,25	7527.05	3.9	188.18	0.59	0.02
		4	4,9	11,25	25967.19	4.4	649.18	1.75	0.05
		5	4,7	10,75	19053.51	4.3	476.34	0.95	0.03
25%M17 +25%Leite (pH=6,17)	M17	1	6,2	10,5	16321.12	4.2	408.03	1.10	0.03
		2	4,8	12,75	65731.72	4.8	1643.29	3.80	0.11
		3	4,7	12,75	65731.72	4.8	1643.29	4.39	0.12
		4	5	12	41314.26	4.6	1032.86	2.66	0.07
		5	4,8	14	142527.94	5.2	3563.20	9.60	0.27
25%MRS +25%Leite (pH=6,12)	MRS	1	4,7	11,75	35389.55	4.5	884.74	2.39	0.07
		2	4,6	14	142527.94	5.2	3563.20	14.43	0.40
		3	4,7	11,75	35389.55	4.5	884.74	2.76	0.08
		4	4,7	13,25	89582.88	5.0	2239.57	6.04	0.17
		5	4,8	11,75	35389.55	4.5	884.74	1.80	0.05
17,36%MRS + 17,36%Leite + 0,13% suplementos (pH= 6,35)	MRS	1	4,5	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	6	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	5,4	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	6,3	9	6447.63	3.81	161.19	0.42	0.01
		5	5,4	9	6447.63	3.81	161.19	0.43	0.01
17,36%M17+ 17,36%Leite + 0,13% suplementos (pH= 6,76)	M17	1	6,5	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	5,1	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	5,1	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	5,7	5,75	861.94	2.94	21.55	0.06	< 0.01
		5	5,6 2,	7,5	2547.12	3.41	63.68	0.17	< 0.01
17,86%M17+ 17,86%Leite + 0,14% sacarose (pH= 6,74)	M17	1	5,7	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	5,1	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	5,1	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	5,3	9,5	8787.19	3.94	219.68	0.57	0.02
		5	5,3	9,25	7527.05	3.88	188.18	0.51	0.01

**Unidades Arbitrárias por litro:**  $AU.mL^{-1} = 10^{(0.2689 * H + 1.3893)}$ , em que H= diâmetro do Halo em milímetros (H, mm); Desvio Padrão (SD = 0.4 – 0.5). **Concentração nisina:**  $mg.L^{-1} = (x) * 0.025 / 1000$ , em que x = Atividade (AU.L<sup>-1</sup>), e 0.025 é o fator de conversão da solução de nisina padrão (0.025 = 2,5% de nisina, conforme instruções da embalagem do produto). **Produção Específica** = (x)/ (DCW), em que x = Nisina (mg.L<sup>-1</sup>), e DCW= massa seca celular (mg.L<sup>-1</sup>)=  $mg_{nisina}.mg^{-1}_{DCW}$ . **Produtividade:**  $mg_{nisina}.mg^{-1}_{DCW}.h^{-1} = (x) / 36$ , em que x = Produção específica  $mg_{nisina}.mg^{-1}_{DCW}$ .

Tabela 6. Atividade de Nisina, produção específica e produtividade nas transferências do cultivo de *L. lactis* ATCC 11454, a cada 36h (30° C, 100 rpm), para meio misto e ou natural (leite desnatado)., em pH final ajustado 2.5.

Meios de cultivo Composição	Pré cultivo	Transf.	Halo mm	Atividade AU.mL <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> AU	Nisina mg.L <sup>-1</sup>	Produção específica mg <sub>nisina</sub> .mg <sup>-1</sup> <sub>DCW</sub>	Produtividade mg <sub>nisina</sub> .mg <sup>-1</sup> <sub>DCW</sub> .h <sup>-1</sup>
100% Leite 1 (pH=6,80)	MRS	1	9,5	1238,51	3,09	30,96	0,08	< 0,01
		2	11	2914,74	3,46	72,87	0,17	< 0,01
		3	13,5	12136,68	4,08	303,42	0,81	0,02
		4	13,5	12136,68	4,08	303,42	0,78	0,02
		5	10,5	2191,29	3,34	54,78	0,15	< 0,01
100% Leite 2 (pH=6,82)	M17	1	9,75	1428,40	3,15	35,71	0,21	0,01
		2	8,75	807,33	2,91	20,18	0,08	< 0,01
		3	10,5	2191,29	3,34	54,78	0,17	< 0,01
		4	13	9124,31	3,96	228,11	0,61	0,02
		5	11,5	3877,04	3,59	96,93	0,20	0,01
25%M17 +25%Leite (pH=6,17)	M17	1	10	1647,40	3,22	41,19	0,11	< 0,01
		2	14	16143,59	4,21	403,59	0,93	0,03
		3	12	5157,03	3,71	128,93	0,34	0,01
		4	14,25	18618,73	4,27	465,47	1,20	0,03
		5	11,25	3361,63	3,53	84,04	0,23	0,01
25%MRS +25%Leite (pH=6,12)	MRS	1	10,5	2191,29	3,34	54,78	0,15	< 0,01
		2	12,5	6859,62	3,84	171,49	0,40	0,01
		3	12,75	7911,34	3,90	197,78	0,53	0,01
		4	13,25	10523,25	4,02	263,08	0,68	0,02
		5	16	50535,90	4,70	1263,40	3,41	0,09
17,36%MRS + 17,36%Leite + 0,13% suplementos (pH= 6,35)	MRS	1	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	10,5	2191,29	3,34	54,78	0,14	< 0,01
		5	10,5	2191,29	3,34	54,78	0,15	< 0,01
17,36%M17+ 17,36%Leite + 0,13% suplementos (pH= 6,76)	M17	1	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	10,75	2527,26	3,40	63,18	0,16	< 0,01
		5	15	28562,75	4,46	714,07	1,92	0,05
17,86%M17+ 17,86%Leite + 0,14% sacarose (pH= 6,74)	M17	1	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		2	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		3	<0,1	<0,1	-	-	-	-
		4	13,5	12136,68	4,08	303,42	0,78	0,02
		5	10,75	2527,26	3,40	63,18	0,17	< 0,01

**Unidades Arbitrárias por litro:**  $AU.L^{-1} = 10^{(0.2478 * H + 0.7388)}$ , em que H= diâmetro do Halo em milímetros (H, mm); Desvio Padrão (SD = 0.4 – 0.5). **Concentração nisina:**  $mg.L^{-1} = (x) * 0.025 / 1000$ , em que x = Atividade (AU.L<sup>-1</sup>), e 0.025 é o fator de conversão da solução de nisina padrão (0.025 = 2,5% de nisina, conforme instruções da embalagem do produto). **Produção Específica** = (x) / (DCW), em que x = Nisina (mg.L<sup>-1</sup>), e DCW= massa seca celular (mg.L<sup>-1</sup>)= mg<sub>nisina</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub>. **Produtividade:**  $mg_{nisina}.mg^{-1}_{DCW}.h^{-1} = (x) / 36$ , em que x = Produção específica mg<sub>nisina</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>DCW</sub>

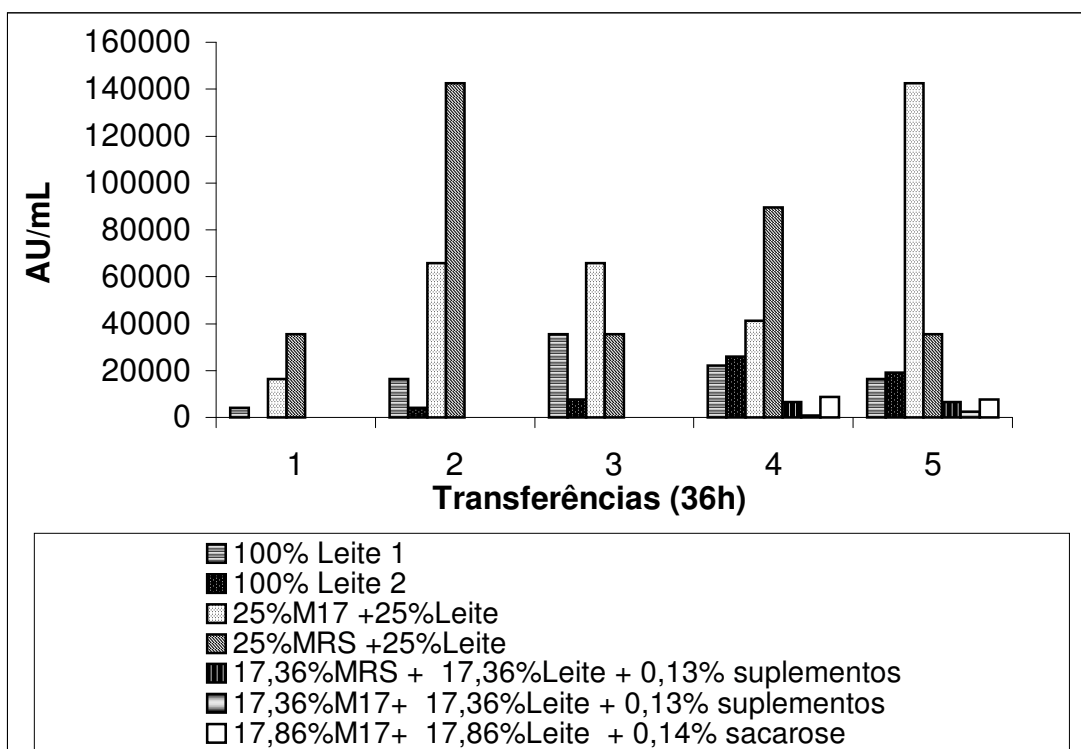


Figura 5.2. Atividade da nisina em AU/mL através das transferências nos ensaios utilizando meio de cultivo natural.

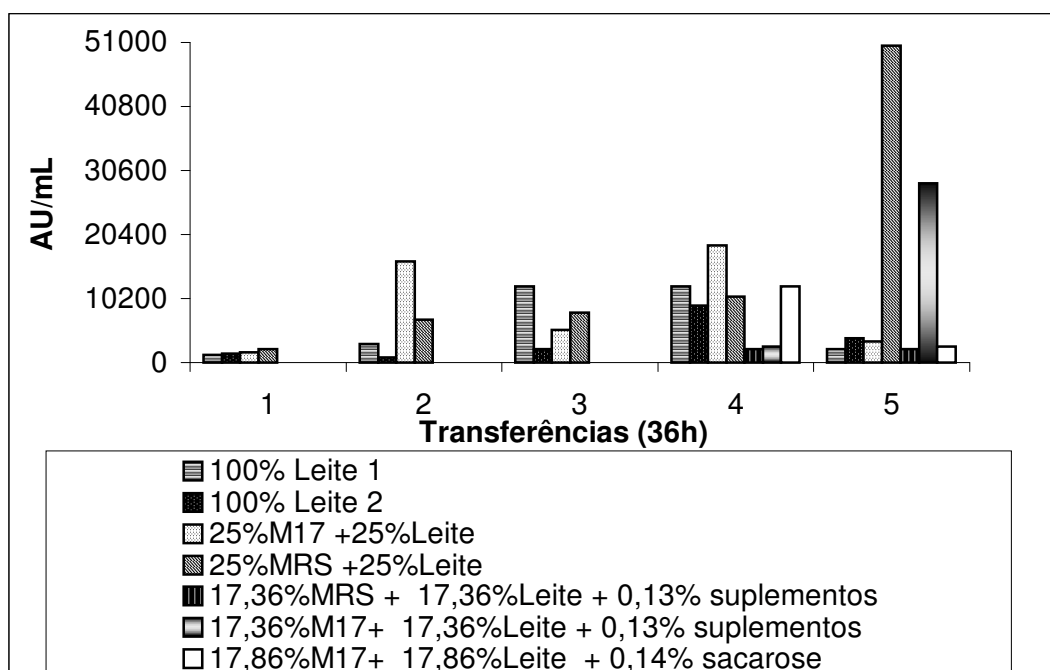


Figura 5.3. Atividade da nisina em AU/mL através das transferências nos ensaios utilizando meio de cultivo natural com pH final ajustado para 2,5.



## 6. Conclusões

Em relação aos meios de cultivo sintéticos os resultados mostraram que a suplementação dos meios de cultivo principalmente com sacarose favoreceu a formação de nisina por *L. lactis* e sua dispersão celular no meio de cultivo.

Verificou-se que ao adicionar a sacarose no meio de cultivo M17, o desempenho em relação à produção de nisina foi até 4 vezes melhor do que aquele onde adicionou suplementos (sacarose, fosfato e asparagina) ao meio caldo M17. Tal afirmativa é reforçada mediante ao fato que em caldo M17 puro, sem adição de qualquer nutriente extra, não houve a detecção de nisina.

A renovação constante do meio de cultivo disponibiliza, às células bacterianas, fonte nutritiva permanente e em excesso, que favorece a fase exponencial de crescimento, a constante produção e liberação de nisina.

O ajuste do valor de pH final do meio de cultivo para 2,5 não se mostrou fator limitante na detecção da nisina e não favoreceu sua dispersão no meio, contestando o fato de que pH inferiores a 3.

Os meios de cultivo compostos pela utilização de Leite desnatado (9,09% sólidos totais) e sua incorporação, na proporção 1:1, aos meios de cultivo (MRS, M17), favoreceu o crescimento e simultânea produção de nisina por *L. lactis*. Porém, na proporção 1:1 dos meios de cultivo, concentração de 25% de MRS ou M17 e 25% de leite desnatado, proporcionou melhores condições para a adaptação e desenvolvimento celular e sua simultânea produção de nisina. Portanto, afirma-se que a produção de nisina está relacionada à concentração nutricional dos meios de cultivo utilizados para o crescimento do microrganismo.

## 7. Perspectivas do Trabalho

Através dos ensaios, realizados neste trabalho, concluímos que o meio de cultivo que tem a melhor capacidade de fornecer subsídios para o crescimento das cepas de *L. lactis* e sua simultânea produção de nisina foi o meio constituído de leite desnatado complementado com meio MRS, na proporção 1:1.

A partir dessa formulação de meio, leite desnatado e caldo MRS, desenvolveremos o estudo relacionando preliminarmente os principais nutrientes que compõe o meio sintético MRS à composição do leite desnatado, e verificar qual deles exerce maior influência tanto no crescimento celular como na expressão da nisina.

Assim estabelecidos os parâmetros nutricionais e de cultivo em agitador rotativo (*shaker*) iniciar-se-ão ensaios utilizando fermentador de bancada New Brunswick (BioFlo 110), com principal objetivo de obter maior produção de nisina pelo microrganismo em um meio de cultivo aplicável aos métodos propostos de custo-benefício adequado.

A atividade bactericida da nisina produzida pelo *L. lactis* no processo fermentativo será comparada, assim como no trabalho desenvolvido, com a nisina adquirida comercialmente. Para isso, utilizarão-se as células de *Lactobacillus sake*, microrganismo Gram-positivo, como microrganismo sensível a ação da nisina. A nova metodologia, inclusa no próximo passo do trabalho, será a utilização um microrganismo pertencente à classe dos Gram-negativos, como indicador da atividade de nisina, utilizando cepas de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  recombinante que expressa *green fluorescent protein* (GFP).

## 8. Bibliografia

BANERJEE, S. e HANSEN, J.N. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. **J.Biol. Chem.**, vol. 263, p. 9508–9514, 1988.

BEHEMER, M.L.A. Tecnologia do Leite. Ed. Nobel, São Paulo, 3 ed., p. 321, 1984.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol 57(4), p.1265–1267, Abr. 1991.

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

CHANDRAPATTI, S.; O’SULLIVAN, D. J. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. **J. Biotechnol.**, vol. 63, p. 229-233, ago.1998.

CHEIG, C. -I.; CHOI, H. -J.; PARK, H.; KIM, S.-B.; KOOK, M.-C; KIM, T.-S.; HWANG, J.-K.; e PYUN, Y.-R. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. **J. Biotechnol.**, vol. 95, p. 225-235, mai. 2002.

CLEVELAND, J; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural, and antimicrobials for food preservations. **Int. J. Food Microbiol.**, v.71, p.1-20, 2001.

COCAIGN- BOUSQUET, M.; LOUBIERE, P.; MATOS, J.; GOMA, G.; LINDLEY, N. Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. **J. Appl. Microbiol.**, v.82, p. 95-100, 1997.

Daba, H.; Lacroix, C.; Huang, J.; Simard, R. E. Influence of growth conditions on production and activity of mesenteric 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteries*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, vol.39, p.166-173, 1993.

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

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

DUBOIS, A. Spiral bacteria in the human Stomach: The gastric *Helicobacter*. **EID - Digestive Diseases Division**. v. 1, p. 79–85, 1995.

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

GÄNZLE, M. G.; C. HERTEL e W. P. HAMMES. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. **Int. J. Food Microbiol.**, vol. 48, p. 37-50, 1999.

GÄNZLE, M. G.; S. WEBER, e W. P. HAMMES. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **Int. J. Food Microbiol.**, **48**, p. 207-217, 1999.

GRAEFFE, T., RINTALA, H., PAULIN, L.E. e SARIS, P.E.J. A natural nisin variant. In: G. Jung and H.-G. Sahl (Eds.), Nisin and novel lantibiotics. pp. 260-268. ESCOM Science Publishers, Leiden, The Netherlands. 1991.

GROSS, E. e MORELL, J.L. The structure of nisin. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 93, p. 4634-4635, 1971.

HELANDER, I.M.; von WRIGHT e MATTILA-SHANHOLM, T.M. Potencial of lactic acid bacteria and navel antimicrobials against gram-negative bacteria. Trends **Food Sci. Technol.**, vol. 8, p. 146-150, 1997.

HOFFMANN, A.; PAG, U.; WIEDEMANN, I. E SAHL, H.G. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotic. **IL Farmaco**, vol. 57, p. 685-691, 2001.

**Hoover, G. D., and L. R. Steenson.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 1993.

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

HURST, M. Nisin. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.27, p.85-123, 1981.

JUNG, G. Lantibiotics—ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and alfa-beta-didehydroamino acids. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, vol. 30, p.1051-1192, 1991.

KALETTA e ENTIAN. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the nisA gene and posttranslational processing of its peptide product. **J Bacteriol.**, vol. 171(3), p. 1597–1601, mar. 1989.

YANG, R.; RAY, B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Food Microbiol.**, vol. 11, p. 281-291, 1994.

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

LIU, W. e HANSEN, N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Appl. Env. Microbiol.**, vol. 56, p. 2551-2558, 1990.

LIU, X.; CHUNG, Y.K.; YANG, S.T. e YOYSEF, A.E. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. **Proc. Biochem.**, vol. 40, p. 13-24, 2003.

LUQUET, F.M. O leite – Do úbere à fábrica de laticínios. Portugal: Publicações Europa-América Ltda, v.1, p. 447, 1985.

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

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

MORAES, D. Otimização da produção de nisina em meio sintético modificado, São Paulo, 2002, 124p.(Dissertação de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

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

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

NIKAIDO, H.. Outer membrane In: F. C. Neidhardt, *et al.* (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. Washington, D.C, ASM Press, p. 29-47, 1996.

PANETTA, J. C. Tipos de leite: O consumidor continua desinformado. Revista Higiene Alimentar, vol. 12, nº 62, 1997.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A.; ADDARIO, G. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 41, p. 388 – 394, 1994.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. **Lett. Appl. Microbiol.**, vol. 19, p.12-15, 1994.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, F.M.; LARA, J.A.F. Variação Sazonal e Correlação Entre Propriedades do Leite Utilizadas na avaliação das Qualidades. Revista Higiene Alimentar, vol. 13, nº64, p 35-39, 1999.

RAY, B. Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as a food biopreservative, In B. Ray, and M. A. Daeschel (ed.), Food Biopreservatives of Microbial Origin., CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 207-264, 1992.

REID, G.; MCGROARTY, J.A., ANGOTTI, R. e COOK, R. L. Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. **Can. J. Microbiol.**, vol. 34(3), p. 974 – 978, 1988.

REDDY, K V R, ARANHA, C, GUPTA, S M, e YEDERY, R D Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: in vitro and in vivo studies. **Reproduction**, vol. 128, p. 117-126, 2004.

RUHR, E. e SAHL, H.G. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potencial of whole cells and on cytoplasmatic and artificial membranes vesicles. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**, vol. 27, p. 841-845, 1985.

SAHL, H.G. e BRANDIS, H. Mode of action of the staphylococcin-like peptide Pep5 and culture conditions effecting its activity. **Zbl. Bakt. Hyg. A**, vol. 252, p. 166-175, 1982.

SAHL, H.G e BIERBAUM, G. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, vol. 52, p. 41-79, 1998.

SAKAMOTO, I.; IGARASHI, M.; KIMURA, K. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. **J. Antimicrob. Chemother.**, vol. 47, p. 709-710, 2001.

SEARS, P.M., SMITH, B.S. STEWART, W.K., GONZALEZ, R. N., RUBINO, S. D., GUSIK S. A., KULISEK, E. S., PROJAN, S. J. E BLACKBURN P. Evaluation of a Nisin-Based Germicidal Formulation on Teat Skin of Live Cows. **J Dairy Sci.**, vol. 75, p. 3185-3190, 1992.

SEN, A.K.; NARBAD, A.; HORN, N.; DODD, M.H.; PARR, A.J.; COLQUHOUN I. e GASSON M.J. Post-translational modification of nisin The involvement of NisB in the dehydration process **Eur. J. Biochem.**, vol. 261, p.524-532, 1999.

STEVENS, K.A., SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A.; KLAENHAMMER T.R. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. **Appl Environ Microbiol.**, vol. 58(5), p. 1786–1788, mai. 1992.

ten BRINK, B., MINEKUS, M., VAN DER VOSSEN, J. M., LEER, R. J.; HUIS IN'T VELD, J.H. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. **J. Appl. Bacteriol.**, vol. 77, p.140-148, ago.1994.

THOMAS, L.V.; DELVES-BROUGHTON, J. New advances in the application of the food preservative nisin. **Res. Adv. Food Sci.**, vl. 2, p. 11-22, 2001.

THOMAS, L.V., CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: Naidu, A.S., Editor, 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 463–524.



TOBA, T., SAMANT, S.K., TOSHIOTA, E.; ITOH, T. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. **Lett. Appl. Microbiol.**, vol. 13, p. 281-286, 1991.

TURNER, S.R., LOVE, R.M.; LYONS, K.M. An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. **Int. Endo. J.**, vol. 37, p. 664–671, 2004.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiol. Rev.**, vol. 56, p. 395-411, 1992.

VESSONI PENNA, T.C, MORAES, D.A., and FAJARDO, D.N. Outgrowth kinetic parameters of activated *Bacillus cereus* spores in cooked rice and in milk with nisin added. **J. Food. Protect.**, vol. 65, p. 419-422, 2002.

VESSONI PENNA, T.C; MORAES, D.A. Optimization Of Nisin Production By *Lactococcus lactis*, **Appl. Biochem. Biotech.**, vol. 98-100, p. 775-789, 2002.

WINKOWSKI, K., MONTIVILLE, T.J. Use of meat isolate, *Lactobacillus bavaricus* MN, to inhibit *Listeria monocytogenes* growth in a model gravy system. **Journal of Food Safety**, vol. 13, p. 19-31, 1992.

WIRJANTORO, T.I, LEWIS, M.J., GRANDISON, A.S., WILLIAMS, G.C.; DELVES-BROUGHTON, J. The Effect of Nisin on the Keeping Quality of Reduced Heat-Treated Milks. **J. Food Protect.**, vol. 64(2), p. 213-219, 2001.

WANDLING, L.R., SHELDON, B.W.; FOEGEDING, P.M. Nisin in Milk Sensitizes *Bacillus* Spores to Heat and Prevents Recovery of Survivors. **J. Food. Protect.**, vol. 65(5), p. 492-498, 1999.

[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)

## ANEXO I

Artigo Completo aceito para publicação em novembro de 2004 na Applied Biochemistry and Biotechnology.

### Production of Nisin by *Lactococcus lactis* in Media with Skimmed Milk

**Thereza Christina Vessoni Penna\***, **Angela Faustino Jozala**,  
**Leticia Célia de Lencastre Novaes**, **Adalberto Pessoa Jr.**

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of  
Pharmaceutical Science, University of São Paulo, SP, Br.

\*E-mail: [tcvpenna@usp.br](mailto:tcvpenna@usp.br)

### Olivia Cholewa

Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA. 97402.

Email: [olivia.cholewa@probes.com](mailto:olivia.cholewa@probes.com)

#### ABSTRACT

Nisin is a bacteriocin that inhibits the germination and growth of Gram-positive bacteria. With nisin expression related to growth conditions of *Lactococcus lactis subsp. lactis*, the effects of growth parameters, media components and incubation time were studied to optimize expression. *L. lactis* ATCC 11454 was grown (100 rpm/30°C/36h) in both M17 and MRS standard broth media (pH=6-7) supplemented with sucrose (1.0-12.5 g.L<sup>-1</sup>); potassium phosphate (0.13 g.L<sup>-1</sup>), asparagine (0.5 g.L<sup>-1</sup>) and sucrose (0.24 g.L<sup>-1</sup>); and diluted 1:1 with liquid non-fat milk. Liquid non-fat milk, undiluted, was also used as another medium (9% total solids, pH=6.5). Nisin production was assayed by agar diffusion using a *Lactobacillus sake* ATCC 15521 (30°C/24h) as the sensitive test organism. The titers of nisin expressed and released in culture media were quantified and expressed in arbitrary units (AU. L<sup>-1</sup> of medium) and converted to known concentrations of "standard nisin" (Nisaplin<sup>®</sup>, g.L<sup>-1</sup>). The detection of nisin activity was less than 0.01 AU.L<sup>-1</sup> in M17 and MRS broths, and 7.5 AU.L<sup>-1</sup> in M17 with 0.14% sucrose or 0.13% of other supplements and, increased to 142.5 AU.L<sup>-1</sup> in M17 diluted with liquid non-fat milk (1:1). The 25% milk added to either 25% M17 or 25% MRS provided the highest levels of nisin assayed.

**Keywords:** Nisin, *Lactococcus lactis*, growth conditions, skimmed milk, *Lactobacillus sake*

## INTRODUCTION

Lantibiotics are small peptides characterized by the presence of an unusual amino acid, lanthionine. Jung **(1)** defines lantibiotics as bacteriocins produced by lactic acid bacteria and are divided into two sub-groups, Type A and Type B. Nisin, a type A bacteriocin, is a 34 residue monomeric pentacyclic peptide (3.4 kDa). Initially isolated by Mattick and Hirsh **(2)**, nisin is produced during the exponential growth phase of the lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* **(3, 4)**.

Like all bacteriocins, nisin has been used as a natural food preservative **(3, 4, 5, 6)** and also in the preservation of pharmaceutical and dental products **(7, 8)**. However, recent research has verified the potential use of nisin for therapeutic purposes, particularly in the treatment of stomach ulcers and colon infections for patients with immune deficiencies **(9, 10)**. Nisin strongly inhibits the outgrowth of spores and the growth of a broad range of gram-positive bacteria **(5, 6)**. The growth of a variety of gram-negative bacteria can also be inhibited by nisin if the outer membrane is first destabilized by EDTA **(11)**.

Nisin was approved by the FDA (Food and Drug Administration) in 1988 as GRAS (Generally Recognized as Safe) **(12)**, satisfying the demands for natural foods with less chemical additives. The most promising and the most important group of natural inhibitors are the bacteriocins with a high economical added value. Commercial nisin is marketed as Nisaplin® and is used in processed foods such as various cheese products, desserts, sausages, bologna, pasteurized liquid egg, sauces and other products. Nisin is a safe, natural antimicrobial and is quite suitable for use in heat-treated or low pH food products **(13)**.

Thomas *et al* **(14)** investigated the efficacy of nisin in controlling the growth of *Bacillus* and *Clostridium* spores, which survive cooking and commonly grow in mashed potatoes. Wirjantoro *et al.* **(15)** investigated the use of nisin in combination with reduced heat treatment (RHT) for milk (117°C for 2 seconds). Wandling *et al.* **(16)** evaluated the potential for altering the survival of spores in thermally treated skimmed milk by supplementing the milk with various concentrations of nisin. Vessoni Penna *et al.* **(6)** verified the influence of nisin on the kinetics of growth from *B. cereus* spores germinated in milk formula. A notable property of nisin is that its solubility and stability increase drastically with the lowering of pH. Nisin is stable at pH 2 and, at this pH, can be autoclaved at 121°C for 15 minutes without inactivation **(17)**.

The production of nisin is growth-associated because expression occurs during mid-exponential phase and increases until reaching a maximum level at the end of the exponential phase or at the beginning of the early-stationary phase **(18, 19, 20, 21, 22)**. Previous studies have shown that nisin is expressed continuously from the initial stages of growth to the stationary phase **(3, 4)**.

There is an extensive background of earlier work done to optimize nisin expression in *Lactococcus lactis*, and many of these references have described MRS and M17 broth for optimal cellular growth and expression **(18, 19, 23, 24, 25)**.

The release of bacteriocin from the cells into the growth medium is dependent on the pH **(19, 20)**. At pH < 6.0, more than 80% of the nisin produced is released into the medium; at pH > 6.0, most nisin is associated with the cellular membrane, but not the cytoplasm **(25)**.

As a culture medium, the high nutritive content of cow's milk provides for excellent growth of *L. lactis* and for the cell's release of nisin into the medium. The cells ferment lactose to lactic acid which causes a decrease in the medium pH, enhancing the release of nisin from the cells into the medium.

Cheigh *et al.* **(23)** studied growth parameters, such as the medium components in M17 broth, growth temperature, pH, and carbon source concentrations that affected bacteriocin production by *L. lactis subsp. lactis* A164. Chandrapatti & O'Sullivan **(25)** developed a rapid plate assay that enabled the quantitative assessment of growth parameters in M17-based media that influence nisin production by growing *L. lactis* directly on the solid medium containing the test factor. This assay was used to assess the influence of carbohydrates and salts on nisin production by *L. lactis*, on a per cell basis and the data were subsequently substantiated with broth cultures. Biwas *et al.* **(17)**, Daba *et al.* **(18)**, ten Brink *et al.* **(22)**, MacGroarty and Reid **(26)**, Toba *et al.* **(27)** related that MRS is a better medium for cell growth and bacteriocin expression. Different concentrations of nutritional supplements such as sucrose, lactose and glucose could be related to nisin expression and release into the culture media by *L. lactis* **(26, 27)**. High concentrations of sucrose correlated to an increase in nisin expression at the end of the stationary phase **(4)**.

Vessoni Penna and Moraes **(28)** studied the influence of sucrose, with asparagine (7.5-75 g.L<sup>-1</sup>), potassium phosphate (6-18 g.L<sup>-1</sup>), and Tween 80 (1-6 g.L<sup>-1</sup>)

added to MRS broth, upon nisin production by *L. lactis*. The formulations that improved nisin expression by *L. lactis* indicated 5 g.L<sup>-1</sup> sucrose with 29 g.L<sup>-1</sup> asparagine in MRS was equivalent to the expression derived with a composition of 12.5 g.L<sup>-1</sup> sucrose with 75 g.L<sup>-1</sup> asparagine in MRS.

In this study, we used the concentrations of 0.14% (1.4 g. L<sup>-1</sup>) and 12.5% (125 g.L<sup>-1</sup>) sucrose to determine if these concentrations would result in the same extent of nisin expression. The use of sucrose and asparagine are also examined to determine the benefits of these supplements used simultaneously in media.

The utilization of synthetic MRS medium with or without sucrose, asparagine and potassium phosphate showed that the expression of nisin is related to nutritional and growth factors, and that cellular growth and nisin expression are concomitant, from fermentation time to the beginning of stationary phase, about 36 hours (**28**), the incubation used throughout this work.

With nisin expression related to growth conditions of *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454, the effects of culturing parameters, such as media components, incubation time, number of culture transfers to fresh medium, were evaluated in this study to optimize the expression of nisin and release into media.

## **Materials and Method**

The nisin-producing strain of *Lactococcus lactis* ATCC 11454 and the nisin-sensitive indicator strain of *Lactobacillus sake* ATCC 9221 were used in this study. The cultures were maintained at -80°C in MRS broth (Man Rogosa Shepeer-Bacto Lactobacilli MRS broth, DIFCO) with 40% (v/v) of glycerol.

The experiments were performed utilizing the following media, as outlined in Tables 1 and 2:

- (i) synthetic MRS broth (Difco<sup>®</sup>) and M17 broth (Oxoid<sup>®</sup>) at their standard concentrations per the manufacturer's recommendations;
- (ii) MRS or M17, at half their standard concentrations (item (i)), with 0.13% of supplements: 0.035% sucrose, 0.018% potassium phosphate and 0.075% asparagine;
- (iii) M17, at half the standard concentration (item (i)), supplemented with 0.14 % sucrose;

- (iv) M17, at the standard concentration, supplemented with 12.5% sucrose;
- (v) Skimmed milk (9.09% dry matter, non-fat milk UHT, Premium, Parmalat, SP, Brazil);
- (vi) MRS or M17, at 25% of their standard concentrations, plus skimmed milk (25% MRS + 25% milk; and 25% M17 + 25% milk);
- (vii) MRS or M17, at 17.36% of their standard concentrations, plus 17.36% of skimmed milk and with 0.13% of supplements: 0.035% sucrose, 0.018% potassium phosphate and 0.075% asparagine;
- (viii) MRS or M17, at 17.86% of their standard concentrations, plus 17.86% of skimmed milk and supplemented with 0.14% sucrose.

Prior to use in defined experimental media, 100  $\mu$ L of frozen glycerol *L. lactis* stock cultures were grown in either MRS or M17 (“pre-inoculum”; 50 mL of broth in 250 mL flasks) and incubated in a rotary shaker (100 rpm) at 30°C for 36 hours. From the pre-inoculum, 5 mL aliquots of the cell suspension were transferred into 50 mL of each experimental medium in 250 mL flasks and incubated for another 36 hours (100rpm/30°C). Cultures were transferred five times (100rpm/30°C/36h) using 5mL aliquots of broth culture for each new volume of the respective medium, as shown in Tables 3 and 4.

After every 36h incubation period, 30 mL of cell suspensions were aseptically withdrawn from the flasks and tested for pH, cellular density, colony number and nisin concentrations. Every type of media examined was performed in triplicate.

The pH measurements were performed in 10 mL of suspension with a Accumet AR20 pH/mV/conductivity meter (Fisher Scientific, USA) calibrated with standard buffer solutions ((Merck; pH= 4, 7, 10) at 25°C.

The cellular biomass concentration, expressed in mg of dried cellular weight per liter of broth (mg.DCW.L<sup>-1</sup>), was determined from the optical density at 660 nm (OD<sub>660</sub>) in a 1 cm pathlength quartz cuvette in a spectrophotometer (Beckman DU-600, CA, USA). The OD<sub>660</sub> readings were calibrated against a standard dried cellular concentration curve of *L. lactis*, which was obtained by the gravimetric method of the biomass (mg.L<sup>-1</sup>) held on the surface of a 0.22  $\mu$ m membrane (Millipore<sup>®</sup>, SP, Br).

The equation for the calibration curve ( $R^2 = 0.998$ ) was given by:  $OD_{660} = 0.0145 + 0.0022 \cdot DCW$  or  $DCW \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = [(OD_{660}) - 0.0145] / (0.0022)$ .

Culture populations were assayed by the plate count method expressed in colony forming units per mL of broth (CFU.mL<sup>-1</sup>), in Plate Count Agar (PCA, Difco®) at 30°C for 24 h. Cell numbers were related to the reference curve associating OD<sub>660</sub> to dry cell weight (mg. DCW.L<sup>-1</sup>) of the same suspension, where OD<sub>660</sub> = 0.01 was equivalent to 10<sup>4</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>.

For nisin activity detection, the cell suspension was centrifuged at 12,000xg for 10 min at 25°C and the supernatant collected was filtered through a 0.22 µm membrane filter (Millipore®). The titers of nisin expressed and released in culture media were quantified and expressed in arbitrary units (AU. L<sup>-1</sup> of medium) by the agar diffusion assay (**6, 28**) utilizing *L. sake* as a sensitive indicator microorganism. *L. sake* was grown in MRS broth and incubated (100rpm/30°C/24h). A 1.5 mL aliquot of the suspension (OD<sub>660</sub> = 0.7) was transferred and mixed with 250 mL of soft agar (MRS broth with 0.8% of bacteriologic grade agar). Each 20 mL of inoculated medium was transferred to Petri plates (100 mm Ø). After the agar solidified, 3 mm wells were cut out with a sterile metal pipe with 5 mm total diameter.

From every medium, 50 µL of culture supernatant from centrifuged *L. lactis* suspension was transferred into the wells on the surface of the *L. sake* inoculated agar. For the milk-supplemented media, culture supernatant, without or with a prior adjustment to pH = 2.5 with 0.2 N HCl, was transferred into the wells. The adjustment to pH = 2.5 prior to centrifugation was done to coagulate the milk, releasing nisin into a clear supernatant (after centrifugation) to facilitate nisin detection. This same pH adjustment was done for solutions used for the standard nisin curve. *L. sake* growth was not inhibited by nisin-free HCl solution (pH = 2.5) added to the wells, confirming earlier studies (**6, 28**).

The plates, without inversion, were incubated at 30°C for 24 hours. After this period, inhibition halos, zones without *L. sake* growth, were measured in four directions and the average diameters (±0.5mm) of the halos related to the arbitrary activities (AU.L<sup>-1</sup>) of nisin formed by the respective cultures, as determined from standard curves using purified nisin as the reference. The relation between (AU.L<sup>-1</sup>) and international units (IU.L<sup>-1</sup>) was determined by using Nisaplin® (a commercial purified nisin preparation containing 25 mg of nisin per g of Nisaplin®, corresponding

to  $10^6$  IU/g Nisaplin<sup>®</sup>; Aplin & Barret Ltda, Beaminster, UK, distributed by Sigma Chemical). A standard solution of nisin was prepared by dissolving 1 g of Nisaplin<sup>®</sup> into 10 mL of 0.02 N HCl with 0.75% (m/v) NaCl (pH = 1.6–1.8). The solution was autoclaved at 121°C for 15 min, and stored at 4°C. Further dilutions of the standard were made as necessary by diluting in 0.02 N HCl. With the standard curve, the concentrations of standard nisin ( $10^0$  to  $10^5$  AU.L<sup>-1</sup>) were related by the diameter of the inhibition halo (H, mm), the activity of nisin from cells grown in the experimental media was determined and expressed in arbitrary units per liter ( $10^0$  to  $10^5$  AU.L<sup>-1</sup>). Based on the calibration curves between AU.L<sup>-1</sup> and IU.L<sup>-1</sup>,  $1.09 \pm 0.17$  AU corresponded to 1.0 IU (40 IU = 1 µg of pure nisin A).

For every media studied, the arbitrary unit was calculated from equations, as follows:

- (i) For the MRS and M17 broths, the relation was:  $AU.L^{-1} = 10^{(0.1847 * H + 0.8259)}$
- (ii) For media containing milk, without adjusting the pH of the culture supernatant, the relation between AU.L<sup>-1</sup> and inhibition halo (H, mm) was:  $AU.L^{-1} = 10^{(0.2689 * H + 1.3893)}$ ;
- (iii) For media with adjusting the pH of the supernatant to pH = 2.5, the relation between AU.L<sup>-1</sup> and inhibition halo (H, mm) was:  $AU.L^{-1} = 10^{(0.2478 * H + 0.7388)}$ .

Using the standard solutions for calibration of nisin activity in all the assays, 0.025 mg of nisin corresponded to  $10^3$  IU.mL<sup>-1</sup>. The activity of nisin expressed in AU.L<sup>-1</sup> was converted for nisin in grams per liters (g.L<sup>-1</sup>), through the relation (3):

$Nisin(g/L) = \frac{(z \times 0.025)}{1000}$ , where  $z = AU.L^{-1}$ . The concentration of nisin was expressed

in grams per liters (g.L<sup>-1</sup>), and in the production of nisin (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), related the formation of nisin in g.L<sup>-1</sup> to a 36 h incubation period. The amount of nisin related to cellular mass (DCW) gave specific production and productivity. The specific production (mg.mg<sup>-1</sup>) is the ratio of nisin concentration (mg.L<sup>-1</sup>) and the cellular mass (mg.DCW.L<sup>-1</sup>). Productivity was expressed in mg nisin.mg<sup>-1</sup> DCW.h<sup>-1</sup> as the ratio of the hourly milligrams of nisin (mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) and cellular mass (mg<sup>-1</sup>.DCW), for 36 hours of incubation.

## RESULTS AND DISCUSSION



With the objective of studying the influence of medium components on nisin expression, a strain of *L. lactis* was transferred 5 consecutive times, after 36 hour intervals of incubation with the same culture medium and incubated under the same conditions. The media additives and incubation times were derived from prior studies carried out in this lab. The activity, productivity and specific production of nisin (expressed in AU.L<sup>-1</sup> and g.L<sup>-1</sup>) for media, with or without milk, are shown in Tables 3, 4, 5 and 6. Tables 5 and 6 show activity, productivity and specific production of nisin, from every transfer after incubating at 100 rpm/30°C/36h, when *L. lactis* cultures were transferred to fresh media; the collected supernatant was adjusted to pH = 2.5 prior to nisin detection. The adjustment to pH = 2.5 prior to centrifugation was done to coagulate the milk, releasing nisin into a clear supernatant (after centrifugation) to facilitate nisin detection. This same pH adjustment was done for solutions used for the standard nisin curve. *L. sake* growth was not inhibited by nisin-free HCl solution (pH = 2.5) added to the wells.

Cheigh et al. **(23)** observed the highest nisin activity early in the stationary phase (20 h, 30°C) of *L. lactis* during batch fermentation in M17 broth (pH = 6.0) with 3% lactose added. In fact, M17 broth with 3% lactose resulted in 8-fold greater nisin expression than either M17 supplemented with 0.5% glucose or in MRS broth. The authors confirmed low levels of nisin expression in both MRS and M17 broth, although these media favored cellular growth, with similar results obtained in this study (10<sup>7</sup> to 10<sup>9</sup> CFU/mL). Chandrapati and O'Sullivan **(25)** observed a 50% increment in nisin expression using sucrose as the carbon source in M17 broth for *L. lactis* culturing, over two transfers. The authors observed that glucose was the optimal carbon source tested, with glycerol the least suitable. They also verified that the incorporation of either sodium or potassium phosphate into a synthetic medium did not improve nisin production and release into the media.

The results of this study obtained in all assays demonstrated that supplements, principally sucrose used with standard concentrations of M17 and MRS (Tables 4,6), were essential for the expression and release of nisin by *L. lactis* into the culture media. Sucrose, at a concentration of 0.14% in M17 (at 50% of the standard concentration, Table 4), directly enhanced the expression of nisin and was shown to be the minimum concentration necessary to improve nisin expression and release into media for all five transfers.

Therefore, nisin expression and release into the media was greater with 0.14% sucrose added to M17 (50%) than with 12.5% sucrose added to the M17 (standard concentration, Table 4), in which nisin was barely detectable at the first and second transfers, low for the third and fourth transfers ( $< 0.1 \text{ g.L}^{-1}$ ) then increasing 25-fold ( $0.3 \text{ g.L}^{-1}$ ) in the fifth transfer.

The culture media with milk provided better conditions for *L. lactis* growth and its concomitant expression of nisin, in relation to MRS and M17 with or without 0.013% supplements or 0.14% sucrose (Table 3, 4).

Milk alone (9.09% dry matter) favored nisin expression and release into the media for all five transfers, from  $0.4$  to  $0.9 \text{ g.L}^{-1}$ , similar to that attained at the first transfer for both 25% MRS+25% milk and 25% M17+25% milk, with the latter media providing the highest nisin concentration,  $3.6 \text{ g.L}^{-1}$  after the fifth transfer. A dilution of these media to 17.36% concentration provided levels of nisin activity ( $0.1 \text{ g.L}^{-1}$  for 17.36% M17+17.36% milk and  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  for 17.36% MRS+17.36% milk) five times lower than those levels of nisin detected relative to 25% concentration for the media assayed (Table 3).

The pre-inoculum of *L. lactis* in MRS (media used prior to the first transfer) stimulated the expression of nisin in “milk 1” media at the first transfer. Using M17 as the pre-inoculum medium for “milk 2” cultures, nisin was undetectable at the first transfer, although both “milk 1” and “milk 2” favored nisin expression and release during the fourth and fifth transfers, with nisin concentrations very similar for both milk media.

The successive transfer of cells into fresh media may provide conditions for greater nisin production above the “ceiling concentration” as noted by Kim *et al.* (29), the repeated dilutions may eliminate the inhibiting effect of high nisin concentrations on the producing organism.

Adjusting culture supernatant to a final pH of 2.5 did not improve the detection of nisin throughout the assays; this pH adjustment decreased the activity of nisin (Tables 5, 6). In many assays (Table 4) even with no adjustment of pH that was lower than 6.0, the detection of nisin activity was not significant ( $p < 0.05$ ) considering MRS and M17 at standard concentration.

The values obtained with standard nisin solutions adjusted to pH 2.5 were lower than the standard nisin without this adjustment (calibration curves); the values

obtained for nisin in the samples with pH adjusted to 2.5 were lower than the results obtained from samples without the pH adjustment.

From these results, nisin production is not directly related to cell number because lower cell populations provided higher nisin concentrations. The 25% milk added to either 25% M17 or 25% MRS provided the highest levels of nisin assayed.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

The authors thank the Brazilian Committees for Scientific Technology Research (CAPES, CNPq and FAPESP) for financial support and biologists Irene A. Machoshvili.

#### **References**

- 1- Jung, G. (1991), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 1051-1192.
- 2- Mattick, A. T. R., and Hirsh, A. (1944), *Lancet.* 2, 3-7
- 3- Buchman, G.W.; Banerjee, S., and Hansen, J.N. (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 16260-16266.
- 4- De Vuyst and Vandamme, E.J. (1992), *J. Gen. Microbiol.* 138, 571-578
- 5- Ray, B. (1992), In: *Food Biopreservatives of Microbial Origin.* Ray, B., Daeschel, M. A., ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-23.
- 6- Vessoni Penna, T.C, Moraes, D.A., and Fajardo, D.N. (2002), *J. Food. Protect.* 65, 419-422.
- 7- Turner, S.R., Love, R.M. and Lyons, K.M. (2004), *Int. Endo. J.* 37, 664-671.
- 8- Sears, P.M., Smith, B.S. Stewart, W.K. (1992), *J Dairy Sci.* 75, 3185-3190.
- 9- Dubois, A. (1995), *EID Digestive Diseases Division.* 1(3), 79-88.
- 10-Sakamoto I., Igarashi, M., and Kimura, K. (2001), *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 709-710.
- 11-Stevens, K.A., Sheldon, B.W.; Klapes, N.A., and Klaenhammer T.R. (1991), *J. Food Protection.* 55, 763-7766.
- 12-De Vuyst, L and Vandamme, E.J. (1994) In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.* De Vuyst, L and Vandamme, E.J., ed., Chapman & Hall, Glasgow, pp. 1-12.
- 13-Thomas, L.V. and Delves-Broughton, J. (2001), *Res. Adv. Food Sci.* 2, 11-22.
- 14-Thomas, L.V., Ingram, R.E., Bevis, H.E., Davies, A., Milne, C.F., and Delves-Broughton, J. (2002), *J. Food. Protect.* 65 (10), 1580-1585.

- 15-Wirjantoro, T.I, Lewis, M.J., Grandison, A.S., Williams, G.C. and Delves-Broughton, J. (2001), *J. Food Protect.* 64(2), 213-219.
- 16-Wandling, L.R., Sheldon, B.W., and Foegeding, P.M. (1999), *J. Food. Protect.* 65(5), 492-498.
- 17-Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M.C., and Ray, B. (1991), *H. Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1265-1267.
- 18-Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., and Simard, R. E. (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 166-173.
- 19- Parente, E., Ricciardi, A., and Addario, G. (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 388-394.
- 20- Parente, E. and Ricciardi, A. (1994), *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 12-15.
- 21- Yang, R. and Ray, B. (1994), *Food Microbiol.* 11, 281-291.
- 22-ten Brink, B., Minekus, M., van der Vossen, J. M., Leer, R. J. and Huis in't Veld, J.H. (1994), *J. Appl. Bacteriol.* 77, 140-148.
- 23-Cheig, C.-I., Choi, H.-J., Park, H., Kim, S.-B., Kook, M.-C, Kim, T.-S., Hwang, J.-K., and Pyun, Y.-R. (2002), *J. Biotechnol.* 95, 225-235.
- 24-Kim, W.S., Hall, R.J., and Dunn, N.W. (1997) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 449-453.
- 25-Chandrapatti, S. and O'Sullivan, D. J. (1998), *J. Biotech.* 63, 229-233.
- 26-MacGroary, J. A. and Reid, G. (1988), *Can. J. Microbiol.* 39, 974-978.
- 27-Toba, T., Samant, S.K., Toshiota, E. and Itoh, T. (1991), *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 281-286.
- 28-Vessoni Penna, T.C and Moraes, D.A. (2002), *Appl. Biochem. Biotech.* 98-100, 775-789.
- 29-Kim, W.S., Hall, R.J., and Dunn, N.W. (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 429-433.

Table 1. Composition of the culture media: MRS broth, skimmed milk and supplements.

Composition	g·100mL <sup>-1</sup>	MRS basic composition	MRS with supplements	Milk	MRS with Milk
	Yeast Extract	0.50	0.35	-	0.13
	Magnesium sulfate	0.01	4.8E-03	-	2.5E-03
	Proteose Peptone	1.00	0.48	-	0.25
	Dextrose	2.00	0.96	-	0.50
	Meat Extract	1.00	0.48	-	0.25
	Ammonium citrate	0.20	0.10	-	0.05
	Potassium phosphate	0.20	0.10	-	0.05
	Tween 80	0.10	0.05	-	0.03
	Manganese sulfate	0.01	4.8E-03	-	2.5E-03
	Sodium acetate	0.50	0.24	-	0.13
	Sucrose	-	0.03	-	-
supplements	Potassium phosphate	-	0.02	-	-
	Asparagine	-	0.08	-	-
	Carbohydrates	-	-	5.00	1.25
	Proteins	-	-	3.00	0.75
	Iron	-	-	0.45	0.11
	Calcium	-	-	0.20	0.05
	Cholesterol	-	-	0.25	0.06
	Total fats	-	-	0.01	2.5E-03
	Saturated fats	-	-	0.12	0.03
	Sodium	-	-	0.05	0.01
	Vitamin A	-	-	0.01	1.5E-03
	Vitamin D	-	-	3.8E-04	9.4E-05
	Total solids (g·100mL <sup>-1</sup> )	5.5	2.79	9.09	3.65

Table 2. Composition of the culture media: M17 broth, skimmed milk and supplements.

Composition	g.100mL <sup>-1</sup>	M17 basic composition	M17 with supplements	M17 with sucrose	M17 with sucrose	Milk	M17 m
M17 Broth	Tryptone	0.53	0.37	0.38	0.53	-	0.
	Yeast Extract	0.26	0.18	0.19	0.26	-	0.
	Magnesium sulfate	0.03	0.02	0.02	0.03	-	0.
	Soy Protein	0.53	0.37	0.38	0.53	-	0.
	Meat Digest	0.53	0.37	0.38	0.53	-	0.
	Ascorbic Acid	0.05	0.04	0.04	0.05	-	0.
	D-glycerophosphate	2.00	1.39	1.43	2.00	-	0.
supplements	Sucrose	-	0.03	0.14	12.50	-	-
	P phosphate	-	0.02	-	-	-	-
	Asparagine	-	0.08	-	-	-	-
	Carbohydrates	-	-	-	-	5.00	1.
Skimmed milk	Proteins	-	-	-	-	3.00	0.
	Iron	-	-	-	-	0.45	0.
	Calcium	-	-	-	-	0.20	0.
	Cholesterol	-	-	-	-	0.25	0.
	Total fats	-	-	-	-	0.01	2.5E
	Saturated fats	-	-	-	-	0.12	0.
	Sodium	-	-	-	-	0.05	0.
	Vitamin A	-	-	-	-	0.01	1.5E
	Vitamin D	-	-	-	-	3.8E-04	9.4E
	g.100mL <sup>-1</sup>	3.93	2.02	2.04	16.43	9.09	3.25
Total solids							

Table 3. Activity, productivity and specific production of nisin for every transfer after 36 h of growth of *L. lactis* ATCC 11454 transferred to a new medium, with milk added.

Media				Activity	Nisin	Specific production	Productivity
Composition	Pre cultive	pH	transfer	(AU. L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(mg.DCWmg <sup>-1</sup> ). 10 <sup>-3</sup>	(mg.DCWmg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
100% Milk 1 (pH=6.80)	MRS	5.1	1	4.1	0.1	2.8	7.6
		4.2	2	16.3	0.4	11.3	26.2
		4.3	3	35.4	0.9	24.6	65.7
		4.7	4	22.2	0.6	15.4	39.8
		4.8	5	16.3	0.4	11.3	30.6
100% Milk 2 (pH=6.82)	M17	5.5	1	26.1	< 0.01	< 0.01	0.1
		4.8	2	4.1	0.1	2.8	11.4
		4.9	3	7.5	0.2	5.2	16.3
		4.9	4	26.0	0.6	18.0	48.6
		4.7	5	19.1	0.5	13.2	26.9
25%M17 +25%milk (pH=6.17)	M17	6.2	1	16.3	0.4	11.3	30.6
		4.8	2	65.7	1.6	45.6	105.4
		4.7	3	65.7	1.6	45.6	122.1
		5.0	4	41.3	1.0	28.7	73.9
		4.8	5	142.5	3.6	99.0	266.8
25%MRS +25%milk (pH=6.12)	MRS	4.7	1	35.4	0.9	24.6	66.4
		4.6	2	142.5	3.6	99.0	400.7
		4.7	3	35.4	0.9	24.6	76.8
		4.7	4	89.6	2.2	62.2	167.7
		4.8	5	35.4	0.9	24.6	50.1
17.36%MRS + 17.36%milk + 0.13% suppl. (pH= 6.35)	MRS	4.5	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		6.0	2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		5.4	3	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		6.3	4	6.4	0.2	4.5	11.5
		5.4	5	6.4	0.2	4.5	12.1
17.36%M17+ 17.36%milk + 0.13% suppl. (pH= 6.76)	M17	6.5	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		5.1	2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		5.1	3	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		5.7	4	0.9	0.0	0.6	1.5
		5.62	5	2.5	0.1	1.8	4.8
17.86%M17+ 17.86%milk + 0.14% sucrose (pH= 6.74)	M17	5.7	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		5.1	2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		5.1	3	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		5.3	4	8.8	0.2	6.1	15.7
		5.3	5	7.5	0.2	5.2	14.1

Arbitrary Unity per liter :  $AU.L^{-1} = 10^{(0.2689 \cdot H + 1.3893)}$ , where H= the diameter of the halo (H, mm), the Standard deviation (SD = 0.4 – 0.5). **Nisin concentration:** g. L<sup>-1</sup> = (x) \*0.025/1000,

where  $x = \text{Activity (AU. mL}^{-1}\text{)}$ , and 0.025 the conversion factor of the standard Nisin solution ( $0.025\text{mg. mL}^{-1} = 10^3\text{AU. mL}^{-1}$ ). **Specific production** =  $(x) / (\text{DCW})$ , where  $x = \text{Nisin concentration (mg.L}^{-1}\text{)}$ , and  $\text{DCW} = \text{dry cell weight (mg.L}^{-1}\text{)} = (\text{mg Nisin. DCW.mg}^{-1}) \cdot 10^{-3}$ . **Productivity**:  $(\text{mg. DCW.mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \cdot 10^{-3} = (x) / 36$ , where  $x = \text{Specific production for 36 h of incubation}$ .



Table 4: Activity, productivity and specific production of nisin for every transfer after 36 h of growth of *L. lactis* ATCC 11454 transferred to a new medium, with synthetic media.

Media				Activity	Nisin	Specific production	Productivity
Composition	Pre inoculum	pH	transfer	(AU. L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(mg.DCWg <sup>-1</sup> ).10 <sup>-3</sup>	(mg.DCWg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
100% MRS (pH=6,5)	MRS	6.2	1	< 0.01	< 0.01	0.6	< 0.01
		6.15	2	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01
		5.65	3	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01
		5.33	4	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
		5.12	5	< 0.01	< 0.01	2.5	< 0.01
100%M17 (pH=6,9)	M17	7.1	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		7.3	2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		6.8	3	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		7.0	4	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		7.2	5	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
50%MRS + 0.13% suppl. (pH=6,13)	MRS	5.9	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		4.7	2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		4.9	3	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		4.7	4	1.5	< 0.01	2.7	1.1
		4.8	5	9.2	0.2	17.3	6.4
50%M17 + 0.13% suppl. (pH=6,28)	M17	6.0	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		6.0	2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		6.1	3	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		6.1	4	7.5	0.2	13.4	5.2
		6.3	5	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
50%M17 + 0.14% sucrose (pH=6,94)	M17	5.5	1	0.6	< 0.01	1.2	0.4
		5.6	2	1.1	< 0.01	1.8	0.8
		5.7	3	0.8	< 0.01	1.5	0.6
		5.9	4	7.5	0.2	13.4	5.2
		6.0	5	6.0	0.2	11.3	4.2
100%M17 + 12.5% sucrose (pH=6,27)	M17	4.5	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		4.5	2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
		4.5	3	0.2	< 0.01	0.4	0.2
		4.5	4	0.2	< 0.01	0.4	0.2
		4.4	5	11.4	0.3	21.4	7.9

**Arbitrary Units per liter:**  $AU.L^{-1} = 10^{(0.1847 * H + 0.8259)}$ , where H= the diameter of the halo (H, mm); the Standard deviation (SD = 0.4 – 0.5). **Nisin concentration:**  $g.L^{-1} = (x) * 0.025 / 1000$ , where x = Activity (AU. mL<sup>-1</sup>), and 0.025 the conversion factor of the standard nisin solution (0.025mg. mL<sup>-1</sup> = 10<sup>3</sup>AU. mL<sup>-1</sup>). **Specific production** = (x) / (DCW), where x = Nisin concentration (mg.L<sup>-1</sup>), and DCW= dry cell weight (mg.L<sup>-1</sup>) = (mg Nisin. DCW.mg<sup>-1</sup>). 10<sup>-3</sup>. **Productivity:**  $g. DCW.g^{-1}. h^{-1} = (x) / 36$ , where x = Specific production (mg Nisin. DCW.mg<sup>-1</sup>), for 36 h of incubation.

Table 5 Activity, productivity and specific production of nisin for every transfer after 36h of growth of *L. lactis* ATCC 11454 transferred to a new medium, with milk added and pH adjusted to 2.5.

Media Composition		Pre inoculum	transfer	Activity (AU. L <sup>-1</sup> )	Nisin (g.L <sup>-1</sup> )	Specific production (mg.DCWg <sup>-1</sup> ).10 <sup>-3</sup>	Productivity (mg.DCWg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
100% Milk 1 (pH=6.80)	MRS	1	1.2	< 0.01	83.7	2.3	
		2	2.9	0.1	168.3	4.7	
		3	12.1	0.3	811.3	22.5	
		4	12.1	0.3	782.0	21.7	
		5	2.2	0.1	147.7	4.1	
100% Milk 2 (pH=6.82)	M17	1	1.4	< 0.01	205.2	5.7	
		2	0.8	< 0.01	81.7	2.3	
		3	2.2	0.1	171.2	4.8	
		4	9.1	0.2	614.8	17.1	
		5	3.9	0.1	197.4	< 0.1	
25%M17 +25%milk (pH=6.17)	M17	1	1.6	< 0.01	111.3	3.1	
		2	16.1	0.4	932.1	25.9	
		3	5.2	0.1	344.7	9.6	
		4	18.6	0.5	1199.7	33.3	
		5	3.4	0.1	226.5	6.3	
25%MRS +25%milk (pH=6.12)	MRS	1	2.2	0.1	148.1	4.1	
		2	6.9	0.2	396.1	11.0	
		3	7.9	0.2	528.8	14.7	
		4	10.5	0.3	678.0	18.8	
		5	50.5	1.3	3405.4	94.6	
17.36%MRS + 17.36%milk + 0.13% suppl. (pH= 6.35)	MRS	1	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01	
		2	< 0.01	< 0.01	0.3	< 0.01	
		3	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01	
		4	2.2	0.1	141.2	3.9	
		5	2.2	0.1	147.7	4.1	
17.36%M17+ 17.36%milk + 0.13% suppl. (pH= 6.76)	M17	1	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01	
		2	< 0.01	< 0.01	0.3	< 0.01	
		3	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01	
		4	2.5	0.1	162.8	4.5	
		5	28.6	0.7	1924.7	53.5	
17.86%M17+ 17.86%milk + 0.14% sucrose (pH= 6.74)	M17	1	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01	
		2	< 0.01	< 0.01	0.3	< 0.01	
		3	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01	
		4	12.1	0.3	782.0	21.7	
		5	2.5	0.1	170.3	4.7	

**Arbitrary Units per liter:**  $AU.L^{-1} = 10^{(0.2478 * H + 0.7388)}$ , where H= the diameter of the halo (H, mm), the Standard deviation (SD = 0.4 – 0.5). **Nisin concentration:**  $g.L^{-1} = (x) * 0.025 / 1000$ , where x = Activity (AU. mL<sup>-1</sup>), and 0.025 the conversion factor of the standard nisin solution (0.025mg. mL<sup>-1</sup> = 10<sup>3</sup>AU. mL<sup>-1</sup>). **Specific production** = (x) / (DCW), where x = Nisin concentration (mg.L<sup>-1</sup>), and DCW= dry cell weight (mg.L<sup>-1</sup>) = (mg Nisin. DCW.mg<sup>-1</sup>). 10<sup>-3</sup>. **Productivity:**  $g. DCW.g^{-1}. h^{-1} = (x) / 36$ , where x = Specific production (mg Nisin. DCW.mg<sup>-1</sup>), for 36 h of incubation.

Table 6 Activity, productivity and specific production of nisin for every transfer after 36 h of growth of *L. lactis* ATCC 11454 transferred to a new medium, with synthetic media and pH adjusted to 2.5.

Media			Activity	Nisin	Specific production	Productivity
Composition	Pre inoculum	transfer	(AU. L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(mg.DCWg <sup>-1</sup> )	(mg.DCWg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
		1	< 0.01	< 0.01	1.0	< 0.1
		2	< 0.01	< 0.01	0.7	< 0.1
MRS	MRS	3	0.1	< 0.01	6.7	0.2
(pH=6,5)		4	0.2	< 0.01	13.6	0.4
		5	0.5	< 0.01	26.7	< 0.1
		1	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
		2	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01
100%M17	M17	3	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
(pH=6,9)		4	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
		5	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
		1	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
50%MRS +		2	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01
0.13% suppl.	MRS	3	0.3	< 0.01	18.5	0.5
(pH=6,13)		4	0.5	< 0.01	30.3	0.8
		5	5.4	0.1	366.0	10.2
		1	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
50%M17 +		2	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01
0.13% suppl.	M17	3	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
(pH=6,28)		4	2.9	0.1	184.9	5.1
		5	0.8	< 0.1	54.0	1.5
		1	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
50%M17 +		2	1.1	< 0.01	63.6	1.8
0.14% sucrose	M17	3	0.0	< 0.01	0.5	< 0.01
(pH=6,94)		4	4.9	0.1	314.7	8.7
		5	1.4	< 0.1	91.9	2.6
		1	< 0.01	< 0.01	0.5	< 0.01
100%M17 +		2	< 0.01	< 0.01	0.4	< 0.01
12.5% sucrose	M17	3	1.9	< 0.01	125.4	3.5
(pH=6,27)		4	1.9	< 0.01	120.9	3.4
		5	6.7	0.2	452.7	12.6

**Arbitrary Units per liter:**  $AU.L^{-1} = 10^{(0.2478 * H + 0.7388)}$ , where H= the diameter of the halo (H, mm), the Standard deviation (SD = 0.4 – 0.5). **Nisin concentration:**  $g.L^{-1} = (x) * 0.025 / 1000$ , where x = Activity (AU. mL<sup>-1</sup>), and 0.025 the conversion factor of the standard nisin solution (0.025mg. mL<sup>-1</sup> = 10<sup>3</sup>AU. mL<sup>-1</sup>). **Specific production** = (x) / (DCW), where x = Nisin concentration (mg.L<sup>-1</sup>), and DCW= dry cell weight (mg.L<sup>-1</sup>)= (mg Nisin. DCW.mg<sup>-1</sup>). 10<sup>-3</sup>. **Productivity:**  $g. DCW.g^{-1}. h^{-1} = (x) / 36$ , where x = Specific production (mg Nisin. DCW.mg<sup>-1</sup>), for 36 h of incubation..

## ANEXO II

Artigo Completo publicado em outubro de 2004 na Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Vol.40, supl. 1, pg. 152-154.

### **Production of Nisin by *Lactococcus lactis* in Media with Non-Fat Milk**

Angela Faustino Jozala (PG), Letícia Célia de Lencastre Novaes (IC), Dante Augusto Moraes, Adalberto Pessoa Júnior, Thereza Christina Vessoni Penna

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology  
School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo /SP,  
angelafj@usp.br

*Nisin production related to the growth conditions of Lactococcus lactis subsp. lactis ATCC 11454, with the effects of growth parameters and media composition, were studied to improve the expression of nisin. L. lactis was transferred five times to M17 or MRS broth media with or without milk and supplements. Nisin production was assayed by agar diffusion using a Lactobacillus sake ATCC 15521 as the sensitive test organism. The expression of nisin was strongly influenced by the addition of milk to either MRS or M17 milk, with the highest production obtained after the 2<sup>nd</sup> and the 5<sup>th</sup> transference, respectively.*

**Keywords:** Nisin, *Lactococcus lactis*, bacteriocin, *Lactobacillus sake*

## **INTRODUCTION**

Nisin is a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Nisin has been applied in products such as cheese curds, melted cheese, cottage cheese, desserts, cheese products obtained by ultra filtration, sausages, bologna, pasteurized liquid egg, sauces, and other products. (Delves-Broughton, *et al.*, 1990; Thomas, L.V. and Delves-Broughton, J., 2001).

Nisin inhibits the growth of spores and the growth of a broad range of Gram-positive microorganisms (Vessoni Penna and Moraes, 2002).

The solubility and stability of nisin increase substantially with a lowering of pH. Nisin is stable at pH 2 and can be autoclaved at 121°C without inactivation. Under alkaline pH there is an increasing loss of activity, with complete inactivation after 30 minutes at 63°C at pH 11 (Hansen, J.N., Chung, Y. and Liu, W., 1991).

## MATERIALS AND METHODS

The nisin-producing *Lactococcus lactis* ATCC 11454 and a nisin-sensitive indicator species, *Lactobacillus sake* ATCC 9221, were used in this study. Stock cultures were maintained at -80°C in MRS broth (Man Rogosa Shepeer-Bacto Lactobacilli, DIFCO) with 40% (v/v) glycerol.

Prior to final evaluation, 100µL of *L. lactis* stock culture was propagated (pre-inoculum) in either MRS or M17 (50 mL of broth in 250 mL Erlenmeyer flasks), and incubated in a rotary shaker (100 rpm) at 30°C for 36 hours. From the growth culture, 5 mL aliquots were transferred to 50 mL of broth in 250 mL Erlenmeyer flasks, incubated for another 36 h (100rpm/30°C). Each media formulation evaluated is shown in Table 1. The repeated transfers into fresh media and incubations were repeated 5 times (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> transfers). After every 36h incubation period, 30 mL of suspension was aseptically withdrawn from the Erlenmeyers and tested for pH, cell density, colony count, and nisin activity (arbitrary units AU mL<sup>-1</sup>). Every test culture was performed in triplicate.

The experiments were performed utilizing the following media: **(i)** synthetic MRS (DIFCO) and M17 broth (Oxoid); **(ii)** Skimmed milk (9.09% dry matter, non-fat milk UHT, Premium, Parmalat, SP, Brazil); **(iii)** 25% skimmed milk plus MRS or M17, with 25% of their standard formulation diluted (1:1); **(iv)** 17.36% skimmed milk plus MRS, with 17.36% of the standard formulation supplemented with 0.035% sucrose, 0.018% potassium phosphate and 0.075% asparagine; **(v)** 17.36% skimmed milk plus M17, with 17.36% of the standard formulation supplemented with 0.035% sucrose, 0.018% potassium phosphate and 0.075% asparagine; **(vi)** 17.86% skimmed milk plus 17.86% M17 supplemented with 0.14% sucrose.

Correlating several concentrations of standard nisin (10<sup>0</sup> to 10<sup>5</sup> AU mL<sup>-1</sup>) with the diameter of the inhibition halo (H, mm), the activity of nisin from sample cultures was determined and expressed in arbitrary units per mL (10<sup>0</sup> to 10<sup>5</sup> AU mL<sup>-1</sup>). Based on the calibration curves between AU mL<sup>-1</sup> and IU mL<sup>-1</sup>, 1.09±0.17 AU corresponded to 1.0 IU (40 IU = 1 µg of pure Nisin A). A standard solution of nisin, utilized in all the assays for calibration of the assay, showed 0.0250 mg of nisin corresponds to 10<sup>3</sup> AU mL<sup>-1</sup>. The relation between AU mL<sup>-1</sup> and inhibition halo (H, mm) for the media containing synthetic media, was:  $AU mL^{-1} = 10^{(0.1847 * H - 0.8259)}$  and for the media containing milk in their formulation, was:  $AU mL^{-1} =$

$10^{(0.2689 * H - 1.3893)}$ . Nisin, expressed in AU mL<sup>-1</sup> was converted to nisin in milligrams per milliliters (mg mL<sup>-1</sup>), through the relation):  $Nisin (mg / mL) = \frac{(z \times 0.025)}{1000}$ , where z = AU mL<sup>-1</sup>.

The values for the production of nisin, related to cellular mass (DCW), provided specific production and productivity data. Specific production (mg g<sup>-1</sup>) was obtained in relation to the activity of nisin (mg L<sup>-1</sup>) and the cellular mass (g DCW L<sup>-1</sup>). Productivity (mg nisin mg<sup>-1</sup> DCW h<sup>-1</sup>) was obtained by relating hourly milligrams of nisin (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) to the cellular mass (DCW) expressed in milligrams of cellular mass (mg DCW L<sup>-1</sup>).

## RESULTS

The milk (9.09% total solids) as a culture medium was formerly inoculated from pre cultures (or pre inoculum) of *L. lactis* developed in MRS broth (suspension in milk 1), and in M17 broth (suspension milk 2). In the milk 1 there was a formation of halo in all five transfers. The second and the fifth transfers had an equivalency of Nisin production, 408.03 mg.L<sup>-1</sup>, and was half of the highest activity that was obtained for the third transference, 884.74 mg.L<sup>-1</sup>. The highest value of productivity, 65.71 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, was detected in the third transfer. In the milk 2 assay, the Nisin production was observed to have started from the second transfer, 101.31 mg.L<sup>-1</sup>, achieve 649.18 mg.L<sup>-1</sup> in the fourth transfer. The highest value of productivity, 48.61 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, was detected in the fourth transfer. The Nisin production detected in milk 1 and milk 2 was similar for the first and second transfers, respectively. The values for the fourth and fifth transfers were similar in both media.

For the media (iv), (v) and (vi), in the first, second and third transfers there was no detection of an inhibition zone. In those media, the Nisin production could be observed from the fourth transfer. In media (iv) the Nisin production values were similar in the fourth and fifth transfers 161.19 mg L<sup>-1</sup>. The highest value of productivity, 12.07 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, was detected in the fifth transfer. In media (v) the Nisin production, observed in the fourth transference was 21.55 mg L<sup>-1</sup> and in the fifth transference 63.68 mg L<sup>-1</sup>. In media (vi) the Nisin production in the fourth transference was 219.68 mg L<sup>-1</sup> and the fifth transference was 188.18 mg L<sup>-1</sup>. These results showed the influence of sucrose on the formation and detection of Nisin, considering the M17 broth. Even though, the original concentrations of the basic components were 17.36%, as recommended by the manufacturer.

For the medium (iii) the halo formations were observed for all transfers. The highest Nisin activity was 3563.20mg.L<sup>-1</sup>, equivalent for both media, and was obtained in the second transfer for MRS+milk and in the fifth transfer for M17+milk. Meanwhile, MRS+milk attained the highest Nisin activity at the second transfer, four times greater than the Nisin concentration (884.74mg.L<sup>-1</sup>) obtained for the first, third and fifth transfers. However, the

Nisin activity did not maintain the level and dropped 4 times at the third and fifth transfers. All results are shown in Table 1.

## CONCLUSIONS

The results obtained in all assays demonstrated that the utilization of supplements, principally sucrose associated to the concentration of the basic components of M17 and MRS were essential for the formation and dispersion of Nisin by *L. lactis* in the culture media. The pre-culture in MRS medium favored the formation and excretion of Nisin by the cells of *L. lactis*, there was a better performance of 1.7 times in relation to the pre culture in M17 medium.

The 25% milk concentration showed a positive influence in the formation and dispersion of Nisin by the cells, and was shown to be the best composition added to 25% M17 or 25% MRS. The Nisin production constancy observed in the M17+milk broth suggests that this medium may be chosen for the next experiments.

Cheigh et al. (2002) observed that a maximum activity of  $131 \times 10^3 \text{AU.mL}^{-1}$  was obtained at early stationary growth of *L. lactis* during batch fermentation in M17 with 3% lactose. The authors also confirmed that the MRS medium obtained the same cellular mass of the culture in M17 although the activity of Nisin detected was lower

Table1. Activity of Nisin, productivity and specific production for every transfer each 36h of growth (30°C/ 100rpm) when the culture of *Lactococcus lactis* ATCC 11454 was transferred to a new medium

Media				AU/mL broth	Nisin	Specific production	Productivity
Composition	Pre cultive	pH	transfer	(AU. mL <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.DCWg <sup>-1</sup> )	(mg.DCWg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
100% Milk 1 (pH=6.80)	MRS	5.1	1	4052.52	101.31	273.82	7.61
		4.2	2	16321.12	408.03	942.33	26.18
		4.3	3	35389.55	884.74	2365.61	65.71
		4.7	4	22243.34	556.08	1433.20	39.81
		4.8	5	16321.12	408.03	1099.81	30.55
100% Milk 2 (pH=6.82)	M17	5.5	1	26.07	0.65	3.75	0.10
		4.8	2	4052.52	101.31	410.17	11.39
		4.9	3	7527.05	188.18	588.05	16.33
		4.9	4	25967.19	649.18	1749.81	48.61
		4.7	5	19053.51	476.34	970.14	0.03
25%M17 +25% milk (pH=6.17)	M17	6.2	1	16321.12	408.03	1102.78	30.63
		4.8	2	65731.72	1643.29	3795.13	105.42
		4.7	3	65731.72	1643.29	4393.83	122.05
		5.0	4	41314.26	1032.86	2662.00	73.94
		4.8	5	142527.94	3563.20	9604.31	266.79
25%MRS +25% milk (pH=6.12)	MRS	4.7	1	35389.55	884.74	2391.19	66.42
		4.6	2	142527.94	3563.20	14425.90	400.72
		4.7	3	35389.55	884.74	2764.81	76.80
		4.7	4	89582.88	2239.57	6036.58	167.68
		4.8	5	35389.55	884.74	1801.91	0.05
17.36%MRS + 17.36% milk + 0.13% suppl. (pH= 6.35)	MRS	4.5	1	26.07	0.65	1.76	0.05
		6.0	2	26.07	0.65	1.51	0.04
		5.4	3	26.07	0.65	1.74	0.05
		6.3	4	6447.63	161.19	415.44	11.54
		5.4	5	6447.63	161.19	434.48	12.07
17.36%M17+ 17.36% milk + 0.13% suppl. (pH= 6.76)	M17	6.5	1	26.07	0.65	1.76	0.05
		5.1	2	26.07	0.65	1.51	0.04
		5.1	3	26.07	0.65	1.74	0.05
		5.7	4	861.94	21.55	55.54	1.54
		5.62	5	2547.12	63.68	171.64	4.77
17.86%M17+ 17.86% milk + 0.14% sucrose (pH= 6.74)	M17	5.7	1	26.07	0.65	1.76	0.049
		5.1	2	26.07	0.65	1.51	0.042
		5.1	3	26.07	0.65	1.74	0.048
		5.3	4	8787.19	219.68	566.18	15.73
		5.3	5	7527.05	188.18	507.21	14.09

**Specific production (mg.DCWg<sup>-1</sup>):** milligrams of Nisin per grams of dry cellular weight.

**Productivity (mg.DCWg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>):** milligrams of Nisin per grams of dry cellular weight per 36 hours.



## ACKNOWLEDGMENTS

FAPESP, CNPq, Capes And Irene Machoshvili

## REFERENCES

- VESSONI PENNA, T.C, MORAES, D.A. Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis*. *Applied Bioch. and Biotech.*, vol. 98-100, p. 775-789, 2002.
- DELVES-BROUGHTON J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R.J., HUGENHOLTZ J. Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie Leewenhoek, Review*, vol. 69, p. 193-202, 1990.
- THOMAS, L.V., DELVES-BROUGHTON, J. New advances in the application of the food preservative nisin. *Res. Adv. Food Sci.*, vol. 2, p. 11-22, 2001.
- SEARS, P.M., SMITH, B.S. STEWART, W.K. Evaluation of a nisin based germicidal formulation on teat skin of live cows. *J Dairy Sci.*, vol. 75, p. 3185-3190, 1992.
- HANSEN, J.N., CHUNG, Y. , LIU, W. Biosynthesis and mechanism of action of nisin and subtilin. *ESCOM Science Publishers In: Nisin and novel lantibiotics, Leiden.*, p. 287-302, 1991.
- CHEIG, C.-I., CHOI, H.-J., PARK, H., KIM, S.-B., KOOK, M.-C, KIM, T.-S., 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 kimchi. *J. Biotechnol.* vol. 95, p. 225-235, 2002.

## ANEXO III

Artigo Completo enviado para publicação em novembro de 2004 para African Journal of Biotechnology ((AJB) (ISSN 1684-5315). No formato "Short Communication"

### **Increase of Nisin Produced by *Lactococcus lactis* in Different Media Through the Five Transfers**

Angela Faustino Jozala<sup>1</sup>, Letícia Célia de Lencastre Novaes<sup>1</sup>, Olivia Cholewa<sup>2</sup>,  
Thereza Christina Vessoni Penna<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology  
School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo /SP,  
✉Corresponding author: [tcvpenna@usp.br](mailto:tcvpenna@usp.br)

<sup>2</sup>Molecular Probes, Inc., Eugene, Or, USA. 97402. Email:  
[olivia.cholewa@probes.com](mailto:olivia.cholewa@probes.com)

#### **ABSTRACT**

Nisin production related to the growth conditions of *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454, the effects of various media components and concomitant release of nisin into the media, were studied., through transfers (five times). Nisin production was assayed by agar diffusion using *Lactobacillus sake* ATCC 15521 as the sensitive test organism. The expression of nisin was strongly influenced by the addition of skimmed milk to both MRS and M17 broth, with the highest production obtained after the second and the fifth transfers, respectively, with maximum expression after 36 h of incubation.

**Keywords:** Nisin, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sake*, bacteriocin, milk

## INTRODUCTION

Nisin is a naturally occurring antimicrobial peptide and was discovered in 1928 (Montville & Chen 1998). Nisin has been applied in the preservation of food (Delves-Broughton, et al., 1990; Thomas, L.V. and Delves-Broughton, J., 2001) and dental products (S. R. Turner, R. M. Love & K. M. Lyons).

Nisin inhibits spore germination and growth of gram-positive bacteria and for this reason, it is widely used as a natural preservative (Vessoni Penna et al., 2002(a), Thomas, L.V., et. al., 2002). Previous reports have described interactions between nisin with EDTA that resulted in enhanced antimicrobial effect against Gram-negative bacteria (Gill, A.O. & Holley R.A., 2003)

Nisin solubility and stability increases substantially with increasing acidity. Nisin is stable at pH 2 and can be autoclaved at 121°C. Under alkaline pH there is an increasing loss of activity, with complete inactivation after 30 minutes at 63°C at pH 11 (Hansen, J.N., Chung, Y. and Liu, W., 1991).

Relating nisin expression to growth conditions of *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC11454, in this study, the effects of various media components through five transfers of cells to fresh media and, concomitant release of nisin into the media, were evaluated.

## MATERIALS AND METHODS (Vessoni Penna and Moraes, 2002b; Jozala, A., et al. 2004)

The nisin-producing *Lactococcus lactis* ATCC 11454 and a nisin-sensitive indicator species, *Lactobacillus sake* ATCC 9221, were used in this study. Stock cultures were maintained at -80°C in MRS broth (Man Rogosa ShepeerBacto Lactobacilli, DIFCO) with 40% (v/v) glycerol.

The nisin standard was Nisaplin® (Sigma Chemical) prepared with a solution of HCl 0,02N. Correlating several concentrations of a nisin standard ( $10^0$  to  $10^5$  AU mL<sup>-1</sup>) with the diameter of the inhibition halo (H, mm), the activity of nisin from sample cultures was determined and expressed in arbitrary units per mL ( $10^0$  to  $10^5$  AU/mL). Based on the calibration curves between AU mL<sup>-1</sup> and IU mL<sup>-1</sup>,  $1.09 \pm 0.17$  AU corresponding to 1.0 IU (40 IU = 1 µg of pure nisin A). A standard solution of nisin, utilized in all the assays for calibration of the assay, showed 0.0250 mg of nisin corresponding to  $10^3$  AU/mL.

For nisin activity detection, the cell suspension was centrifuged at 12,000xg for 10 min at 25°C and the supernatant collected was filtered through a 0.22 µm membrane filter (Millipore®). The titers of nisin expressed and released in culture media were quantified and expressed in arbitrary units (AU. mL<sup>-1</sup> of medium) by the agar diffusion assay utilizing *Lactobacillus sake* as a sensitive indicator microorganism. *L. sake* was grown in MRS broth and incubated (100rpm/30°C/24h). A 1.5 mL aliquot of the suspension (OD<sub>660</sub> = 0.7) was transferred and mixed with 250 mL of soft agar (MRS broth with 0.8% of bacteriologic grade agar). Each 20 mL of inoculated medium was transferred to Petri plates (100 mm dia.). After the agar solidified, ~3 mm wells were cut out with a sterile metal pipe with 5 mm total diameter.

## RESULTS

The recommended concentrations for the synthetic media showed not the release of nisin by the bacteria (Table 1), even if supplemented (100% MRS plus 0.5% sucrose). However, at half the recommended concentrations, 50% MRS plus 0.13% supplements, 50% M17 plus 0.13% supplements and 50% M17 plus 0.14% sucrose, provided equivalent nisin activity between the fourth and fifth transfer cultures.

The sucrose added to MRS in previous work, favors the production of nisin by cells, on increasing the concentration of sucrose to 5 g/L, the maximum titre of nisin varied from 298 to 7770 AU/mL (Vessoni Penna and Moraes, 2002b).

The addition of 0.14% sucrose into 50% M17 increased nisin expression at the fourth transfer, while the addition of 12.5% sucrose into 100% M17 stimulated nisin production at the fifth transfer. The release of the nisin by cells is depend on the media pH value.

Cheigh et al. observed the highest nisin activity early in the stationary phase (20 h, 30°C) of *L. lactis* during batch fermentation in M17 broth (pH = 6.0) with 3% lactose added. In fact, M17 broth with 3% lactose resulted in 8-fold greater nisin expression than either M17 supplemented with 0.5% glucose or in MRS broth. The authors confirmed low levels of nisin expression in both MRS and M17 broth, although these media favored cellular growth, with similar results obtained in this study ( $10^7$  to  $10^9$  CFU/mL). Chandrapati and O'Sullivan observed a 50% increment in nisin expression using sucrose as the carbon source in M17 broth for *L. lactis* culturing, over two transfers. The authors observed that glucose was the optimal carbon source tested, with glycerol the least suitable. They also verified that the incorporation of either sodium or potassium phosphate into a synthetic medium did not improve nisin production and release into the media.

The media concentrations to 17.36% milk added with 17.36% MRS or 17.36% M17, reduced nisin activity sixteen times, from the maximum of 3563.20 mg/L obtained of the 25% M17 or MRS + 25% milk, to 63.68 mg/L obtained of the 17.86% M17 or MRS + 17.86% milk, related to the fifth transfer (Table 2). In these formulations, in the first, second and third transfers, the detection of an inhibition zone was negligible but significant nisin production could be observed from the fourth transfer culture.

In the formulation using 17.86% MRS + 17.86% milk, nisin production values were similar in the fourth and fifth transfers, 161.19 mg/L. The highest productivity value, 12.07 mg/L/h, was detected in the fifth transfer culture. In the formulation using 17.86% M17 + 17.86% milk, nisin production at the fourth transfer was 21.55 mg L<sup>-1</sup> and 63.68 mg L<sup>-1</sup> in the fifth transfer culture. In media consisting of 17.86% M17 + 17.86% milk + 0.14% sucrose, nisin production in the fourth transfer culture was 219.68 mg/L and 188.18 mg/L in the fifth transfer. These results show the influence of sucrose in M17 broth on the release and detection of nisin, even though the original concentrations of the basic media components were 60% of manufacturer's recommended formulation. (Table 2)

The type of components and their concentration in 100% milk media (milk 1 and milk 2), at pH 4.7, favored the expression of the nisin (Table 2). In this results the pre-inoculum growth in MRS favored the release of nisin by *L. lactis*; there was 1.7 times greater concentration of nisin relative to the pre-inoculum grown in M17.

Nisin expression was four times higher for the second and third transfer cultures in milk 1 relative to milk 2, with the pre inoculum derived from cells grown in

MRS for 100% milk 1 and, in M17 for 100% milk 2. These results emphasize the importance of the type of medium used for the pre-inoculum culturing of *L. lactis*.

The formulations of 25% milk plus 25% M17 and 25% milk plus 25% MRS were found to stimulate optimal bacteriocin production. Both media define the final composition of the nutrients favorable to nisin expression and release into media at a final pH between 4.6 and 4.8. (Table 2)

The 25% milk concentration showed a positive influence in the formation and release of nisin by the cells and was shown to be the best component to add to 25% M17 or 25% MRS. Nisin production increased consistently from first to fifth transfer in the M17+milk media; this formulation was selected for future studies.

## REFERENCES

CHANDRAPATI, C. and SULLIVAN, D. J. (1998). Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*. *J. Biotechnol.* 63: 229-233.

CHEIG, C.-I., CHOI, H.-J., PARK, H., KIM, S.-B., KOOK, M.-C, KIM, T.-S., HWANG, J.-K., PYUN, Y.-R. (2002). Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated kimchi. *J. Biotechnol.* 95: 225-235.

DELVES-BROUGHTON J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R.J., HUGENHOLTZ J. (1990). Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek, Review*, 69: 193-202.

GILL, A.O. and HOLLEY, R.A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24<sup>o</sup> C. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 251-259.

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

JOZALA, A., NOVAES, L.C.L., PESSOA Jr., A., MORAES, D.A., VESSONI PENNA, T.C, CHOLEWA, O. (2004). Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with non-fat milk. In: 26<sup>th</sup> Symposium on Biotechnology for fuels and Chemicals: Chattanooga, Tennessee: Poster Session 3-36.

KLAENHAMMER, TR. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 39–86.

MONTEVILLE, T.J. and CHEN, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 511-519.

SEARS, P.M., SMITH, B.S. STEWART, W.K. (1992). Evaluation of a nisin based germicidal formulation on teat skin of live cows. *J Dairy Sci.* 75: 3185-3190.

THOMAS, L.V. and DELVES-BROUGHTON, J. (2001) New advances in the application of the food preservative nisin. *Res. Adv. Food Sci.* 2: 11-22.

THOMAS, L.V., INGRAM, R.E., BEVIS, H.E., DAVIES, A., MILNE, C.F., and DELVES-BROUGHTON, J. (2002). Effective use of nisin to control *Bacillus* and *Clostridium* spoilage of a pasteurized mashed potato product. *J. Food. Protect.* 65: 1580-1585.

TURNER, S.R., LOVE, R.M. and LYONS, K.M. (2004). An *in vitro* investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *Int. Endodontic Journal* 37: 664-671.

VESSONI PENNA, T.C, MORAES, D.A. (2002) a. The effect of nisin on growth kinetics from activated *Bacillus cereus* spores in cooked rice and milk, *J. Food protection.* 65: 419-422.

VESSONI PENNA, T.C, MORAES, D.A. (2002) b. Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis*. *Applied Bioch. Biotech.* 98-100:775-789.

Table 1 Nisin activity, productivity and specific production for every transfer, each incubated at 100 rpm/30°C/36 h, with *Lactococcus lactis* ATCC 11454 cultures transferred to fresh media with either synthetic MRS or M17 components.

Media		pH	Transfer	Activity (AU/mL)	Nisin (mg/L)	Specific production (mg/DCWg)	Productivity (mg/DCWg .h <sup>-1</sup> )
Composition	Pre Inoculum						
100% MRS (pH=6.5)	MRS	6.15	1	12.69	0.317	0.58	0.02
		6.15	2	12.99	0.325	0.45	0.01
		5.65	3	11.57	0.289	0.44	0.01
		5.33	4	12.99	0.325	0.52	0.01
		5.12	5	21.06	0.527	2.49	0.08
100%M17 (pH=6.9)	M17	7.1	1	6.98	0.18	0.01	0.01
		7.3	2	6.98	0.18	0.01	0.01
		6.8	3	6.98	0.18	0.01	0.01
		7.0	4	6.98	0.18	0.01	0.01
		7.2	5	6.98	0.18	0.01	0.01
50%MRS + 0.13% suppl. (pH=6.13)	MRS	5.9	1	6.98	0.18	0.01	0.01
		4.7	2	6.98	0.18	0.01	0.01
		4.9	3	6.98	0.18	0.01	0.01
		4.7	4	1516.44	37.91	2.71	1.05
		4.8	5	9242.72	231.07	17.30	6.42
50%M17 + 0.13% suppl. (pH=6.28)	M17	6.0	1	6.98	0.18	0.01	0.01
		6.0	2	6.98	0.18	0.01	0.01
		6.1	3	6.98	0.18	0.01	0.01
		6.1	4	7472.23	186.81	13.37	5.19
		6.3	5	6.98	0.18	0.01	0.01
100%MRS + 0.5% sucrose. (pH=6.75)	MRS	5.15	1	8.78	0.62	0.01	0.000011
		5.22	2	11.57	1.96	0.01	0.000014
		5.15	3	17.12	9.75	0.02	0.000019
		4.91	4	23.09	34.87	0.02	0.000024
		5.12	5	12.99	3.16	0.02	0.000017
50%M17 + 0.14% sucrose (pH=6.94)	M17	5.5	1	647.78	16.19	1.22	0.45
		5.6	2	1102.30	27.56	1.77	0.77
		5.7	3	801.26	20.03	1.49	0.56
		5.9	4	7472.23	186.81	13.37	5.19
		6.0	5	6040.88	151.02	11.31	4.19
100%M17 + 12.5% sucrose (pH=6.27)	M17	4.5	1	6.98	0.18	0.01	0.01
		4.5	2	6.98	0.18	0.01	0.01
		4.5	3	223.71	5.59	0.42	0.16
		4.5	4	223.71	5.59	0.40	0.16
		4.4	5	11432.73	285.82	21.40	7.94

**Arbitrary Unity/mL** (AU/mL) =  $10^{(0.1847 \cdot x + 0.8259)}$ , where x = the diameter of the halo (H, mm)

**Nisin concentration** (mg/L) = (x) \* 0.025, where x = Activity (AU/mL), and 0.025 the conversion factor of the standard Nisin solution (0.025mg/mL =  $10^3$  AU/mL).

**Productivity** (mg/L h-1) = (x)/36, where x = Nisin concentration (mg/L).

**Specific production:** mg/g h-1 = (x)/DCW, where x = Productivity (mg/ L h-1), and DCW = dry cell weight(g/L).

Table 2 Nisin activity, productivity and specific production for every transfer, each incubated at 100 rpm/30°C/36 h, with *Lactococcus lactis* ATCC 11454 cultures transferred to fresh media containing milk.

Media		pH	transfer	Activity (AU/mL)	Nisin (mg/L)	Specific production (mg/DCWg)	Productivity (mg/DCWg .h <sup>-1</sup> )
Composition	Pre inoculum						
100% Milk 1 (pH=6.80)	MRS	5.1	1	4052.52	101.31	2.81	7.61
		4.2	2	16321.12	408.03	11.33	26.18
		4.3	3	35389.55	884.74	24.58	65.71
		4.7	4	22243.34	556.08	15.45	39.81
		4.8	5	16321.12	408.03	11.33	30.55
100% Milk 2 (pH=6.82)	M17	5.5	1	26.07	0.65	0.02	0.10
		4.8	2	4052.52	101.31	2.81	11.39
		4.9	3	7527.05	188.18	5.23	16.33
		4.9	4	25967.19	649.18	18.03	48.61
		4.7	5	19053.51	476.34	13.23	26.95
25%M17 +25% milk (pH=6.17)	M17	6.2	1	16321.12	408.03	11.33	30.63
		4.8	2	65731.72	1643.29	45.65	105.42
		4.7	3	65731.72	1643.29	45.65	122.05
		5.0	4	41314.26	1032.86	28.69	73.94
		4.8	5	142527.94	3563.20	98.98	266.79
25%MRS +25% milk (pH=6.12)	MRS	4.7	1	35389.55	884.74	24.58	66.42
		4.6	2	142527.94	3563.20	98.98	400.72
		4.7	3	35389.55	884.74	24.58	76.80
		4.7	4	89582.88	2239.57	62.21	167.68
		4.8	5	35389.55	884.74	24.58	50.05
17.36%MRS + 17.36% milk + 0.13% suppl. (pH= 6.35)	MRS	4.5	1	26.07	0.65	0.02	0.05
		6.0	2	26.07	0.65	0.02	0.04
		5.4	3	26.07	0.65	0.02	0.05
		6.3	4	6447.63	161.19	4.48	11.54
		5.4	5	6447.63	161.19	4.48	12.07
17.36%M17+ 17.36% milk + 0.13% suppl. (pH= 6.76)	M17	6.5	1	26.07	0.65	0.02	0.05
		5.1	2	26.07	0.65	0.02	0.04
		5.1	3	26.07	0.65	0.02	0.05
		5.7	4	861.94	21.55	0.60	1.54
		5.62	5	2547.12	63.68	1.77	4.77
17.86%M17+ 17.86% milk + 0.14% sucrose (pH= 6.74)	M17	5.7	1	26.07	0.65	0.02	0.05
		5.1	2	26.07	0.65	0.02	0.04
		5.1	3	26.07	0.65	0.02	0.05
		5.3	4	8787.19	219.68	6.10	15.73
		5.3	5	7527.05	188.18	5.23	14.09

**Arbitrary Unity/mL** (AU/mL) =  $10^{(0.2689 \cdot x + 1.3893)}$ , where x= the diameter of the halo (H, mm)

**Nisin concentration** (mg/L) = (x) \* 0.025, where x= Activity (AU/mL), and 0.025 the conversion factor of the standard Nisin solution (0.025mg/mL =  $10^3$  AU/mL).

**Productivity** (mg/L h<sup>-1</sup>) = (x)/36, where x = Nisin concentration (mg/L).

**Specific production:** mg/g h<sup>-1</sup> = (x)/DCW, where x = Productivity (mg/ L h<sup>-1</sup>), and DCW = dry cell weight(g/L).

## ANEXO IV



**Resumo publicado em anais de evento: 5º Simpósio Latino Americano de Ciências dos Alimentos. 03-06 nov. 2003. Campinas – SP. Apresentação em poster.**

PRODUÇÃO DE NISINA POR *LACTOCOCCUS LACTIS* ATCC11454 UTILIZANDO LEITE DESNATADO COMO MEIO DE CULTIVO. JOZALA, A. F. (1); VESSONI PENNA, T. C. (1); MORAES, D. A. (1); MATSIKO, F.I. (1) Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bl. 16, 05508-900 São Paulo, Brasil.\*E-mail: [ajozala@hotmail.com](mailto:ajozala@hotmail.com)

A nisina tem sido utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica como antimicrobiano natural. O objetivo deste trabalho foi comparar a produção de nisina por *Lactococcus lactis* ATCC 11454, em meios de cultivo utilizando leite desnatado como fonte nutricional, durante cinco repiques a cada 36h/ 30°C/ 90rpm. A atividade (unidades arbitrárias/mL, AU/mL) da nisina (potência) foi expressa em logaritmo decimal da potência (Log Pot), calculada a partir do halo (H, mm) de inibição de *Lactobacillus sake*, referente aos cultivos: leite (A) utilizando M17 como meio de cultivo para o pré-inóculo e leite (B) utilizando MRS como meio de cultivo para o pré-inóculo. A potência (AU/mL) da nisina obtida foi relacionada à concentração de 25000 µg nisina comercial por g NISAPLIN® (Sigma), correspondendo a 10<sup>6</sup> AU/mL. O cultivo A proporcionou melhores condições de formação de nisina por *L. lactis*, sendo as potências obtidas no 3º repique do ensaio A foram maiores àquelas obtidas no 4º repique do ensaio B, ao redor de 4,0 Log Pot (1500 µg/mL).

## ANEXO V

Resumo publicado em anais de evento: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. 17-20 nov. 2003. Florianópolis – SC. Apresentação em poster.

### **Nisin Production for *Lactococcus lactis* ATCC11454 in growth media with cream milk.**

**Jozala, A. F.<sup>1\*</sup>, Penna, T. C. V.<sup>1</sup>, Matsiko, F. I.<sup>1</sup>, Pessoa Jr., A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bl. 16, 05508-900 São Paulo, Brasil. \*E-mail: [ajozala@hotmail.com](mailto:ajozala@hotmail.com)

#### **Resumo**

A nisina tem sido utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica como antimicrobiano natural. O objetivo deste trabalho foi comparar a produção de nisina por *Lactococcus lactis* ATCC 11454, em meios de cultivo sintéticos (MRS e M17) suplementados com leite desnatado (1:1), durante cinco repiques a cada 36h/ 30°C/ 90rpm. A atividade (unidades arbitrárias/mL, AU/mL) da nisina (potência) foi expressa em logaritmo decimal da potência (Log Pot), calculada a partir do halo (H, mm) de inibição de *Lactobacillus sake*, referente aos cultivos: em M17 + leite (A) e em MRS + leite (B). A potência (AU/mL) da nisina obtida foi relacionada à concentração de 25000 µg nisina comercial por g NISAPLIN® (Sigma), correspondendo a 10<sup>6</sup> AU/mL. O cultivo B proporcionou melhores condições de formação de nisina por *L. lactis*, sendo as potências obtidas no 2º repique do ensaio B semelhantes às aquelas obtidas no 5º repique do ensaio A, ao redor de 5,0 Log Pot (13000 µg/mL).

#### **Abstract**

The bacteriocin nisin has been widely used in the food and pharmaceutical industries as natural antimicrobial peptide. The objective was to compare nisin production by *Lactococcus lactis* ATCC 11454, in synthetic growth media supplied with cream milk (1:1), during five growth (36h/ 30°C/ 90rpm) transferences to the media: (A, MRS+milk) and (B, M17+milk). The activity (arbitrary units/mL, AU/mL) of

the obtained nisin (potency) was expressed in decimal logarithm of the potency (Log Pot), which was determined by the inhibitory halo (H, mm) for the *Lactobacillus sake*'s growth. The potency (AU/mL) of the nisin obtained was related to the concentration of the 25000 µg commercial nisin for g NISAPLIN® (Sigma), correspond to 10<sup>6</sup> AU/mL, The medium B was shown to give better growth conditions to *L. lactis* for the production of nisin, which potency obtained in the 2<sup>nd</sup> transference was similar to that obtained in the 5<sup>th</sup> transference in the medium A, about 5.0 Log Pot (13000 µg/mL).

## ANEXO VI

Resumo publicado na Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas: VII Semana de Ciência e Tecnologia. Apresentado em poster no XVIII Seminário de Pós-Graduação. 13-17 out. 2003.

### **PRODUÇÃO DE NISINA POR *LACTOCOCCUS LACTIS* ATCC11454 UTILIZANDO LEITE DESNATADO COMO SUPLEMENTO NO MEIO DE CULTIVO**

ANGELA FAUSTINO JOZALA (PG), LETICIA CÉLIA LENCASTRE (IC), DANTE AUGUSTO MORAES, THEREZA CHRISTINA VESSONI PENNA

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, FCF/USP

#### **Resumo**

A nisina tem sido utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica como antimicrobiano natural. O objetivo deste trabalho foi comparar a produção de nisina por *Lactococcus lactis* ATCC 11454, em meios de cultivo sintéticos (MRS e M17) suplementados com leite desnatado (1:1), durante cinco repiques a cada 36h/ 30°C/ 90rpm. A atividade (unidades arbitrárias/mL, AU/mL) da nisina (potência) foi expressa em logaritmo decimal da potência (Log Pot), calculada a partir do halo (H, mm) de inibição de *Lactobacillus sake*, referente aos cultivos: em M17 + leite (A) e em MRS + leite (B). A potência (AU/mL) da nisina obtida foi relacionada à concentração de 25000 µg nisina comercial por g NISAPLIN® (Sigma), correspondendo a 10<sup>6</sup> AU/mL. O cultivo B proporcionou melhores condições de formação de nisina por *L. lactis*, sendo as potências obtidas no 2º repique do ensaio B semelhantes àsquelas obtidas no 5º repique do ensaio A, ao redor de 5,0 Log Pot (13000 µg/mL).

## ANEXO VII

Resumo enviado para apresentação em poster.

26<sup>th</sup> Symposium on Biotechnology For Fuels and Chemicals. May 9 - 12, 2004 Chattanooga Choo Choo Holiday Inn & Centennial Center Chattanooga, TN USA.

### Production of Nisin by *Lactococcus lactis* in Media with Non-Fat Milk

Angela Faustino Jozala, Letícia Célia Lencastre Novaes, Adalberto Pessoa Jr. Dante Augusto Moraes, Thereza Christina Vessoni Penna\*

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, SP, Br. \*E-mail: [tcvpenna@usp.br](mailto:tcvpenna@usp.br)

**Olivia Cholewa**

Molecular Probes, Inc. Eugene, Or, USA. 97402. Email: [olivia.cholewa@probes.com](mailto:olivia.cholewa@probes.com)

Nisin is a bacteriocin that inhibits the germination and growth of Gram-positive bacteria. With nisin expression related to the growth conditions of *Lactococcus lactis subsp. lactis*, the effects of growth parameters, media components and incubation time, were studied to optimize the expression of nisin. *L. lactis* ATCC 11454 was grown (100 rpm/30°C/72h) in either M17 or MRS basic broth media (pH = 6-7) supplemented with either sucrose (1.0-12.5 g L<sup>-1</sup>); potassium phosphate (0.13 g L<sup>-1</sup>), asparagine (0.5 g L<sup>-1</sup>) and sucrose (0.24 g L<sup>-1</sup>); and diluted 1:1 with liquid non-fat milk. Liquid non-fat milk, undiluted, was also used as another basic medium (9–10 % total solids, pH = 6.5). Aliquots of cultured broth (OD<sub>660</sub> = 0.7; 3.20 mg DCW/L or 10<sup>2</sup> CFU/mL) from each group were transferred into fresh broth and incubated further (100 rpm/30°C/72h). Nisin production was assayed by agar diffusion using a *Lactobacillus sake* ATCC 15521 (30°C/24h) as the sensitive organism. Comparing diameters of growth inhibition of *L. sake* from wells of nisin of known concentration (“standard nisin”; Nisaplin, Sigma) to diameters of inhibition from defined volumes of *L. lactis* sp. *lactis* broth cultures, the amount of nisin in broth cultures was measured as arbitrary units (AU mL<sup>-1</sup>) converted to nisin mg/mL, with 25 mg of standard nisin/g corresponding to 10<sup>6</sup> AU/g. Maximum nisin production was 465.4 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> for M17 supplemented with sucrose (12.5%) and non-fat milk (ratio 1:1), related to *L. lactis* growth at up to 36 h of incubation (final pH 5.0±0.5). The production of 98.9 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> for M17 and MRS, both with non-fat milk 1:1, was 17 times higher than the amount of nisin produced in cultures grown in undiluted non-fat milk or MRS broth alone. The detection of nisin activity was less than 10 AU mL<sup>-1</sup> in M17 broth, 200 AU mL<sup>-1</sup> in M17 supplemented with 0.1% sucrose and increased to a maximum of 1.4 x 10<sup>5</sup> AU mL<sup>-1</sup> in M17 diluted with liquid non-fat milk (1:1). The amount of nisin expressed was strongly influenced by the incorporation of non-fat milk to both M17 and MRS broths (1:1), with the maximum amount expressed after 36 h of incubation. Nisin is widely used as a natural additive for preserving foods, pharmaceutical and dental products, and as a therapeutic agent. This study was performed to improve large scale nisin production to meet the demand of its beneficial use in health-care products.

**Keywords:** Nisin, *Lactococcus lactis*, bacteriocin, *Lactobacillus sake*

**Acknowledgments:** FAPESP, CNPq, Capes.

## APÊNDICE 1

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)