

# Esterilização

D10 – Dose de redução decimal

D0 – Dose de inativação

DSAL – Dose para assegurar SAL

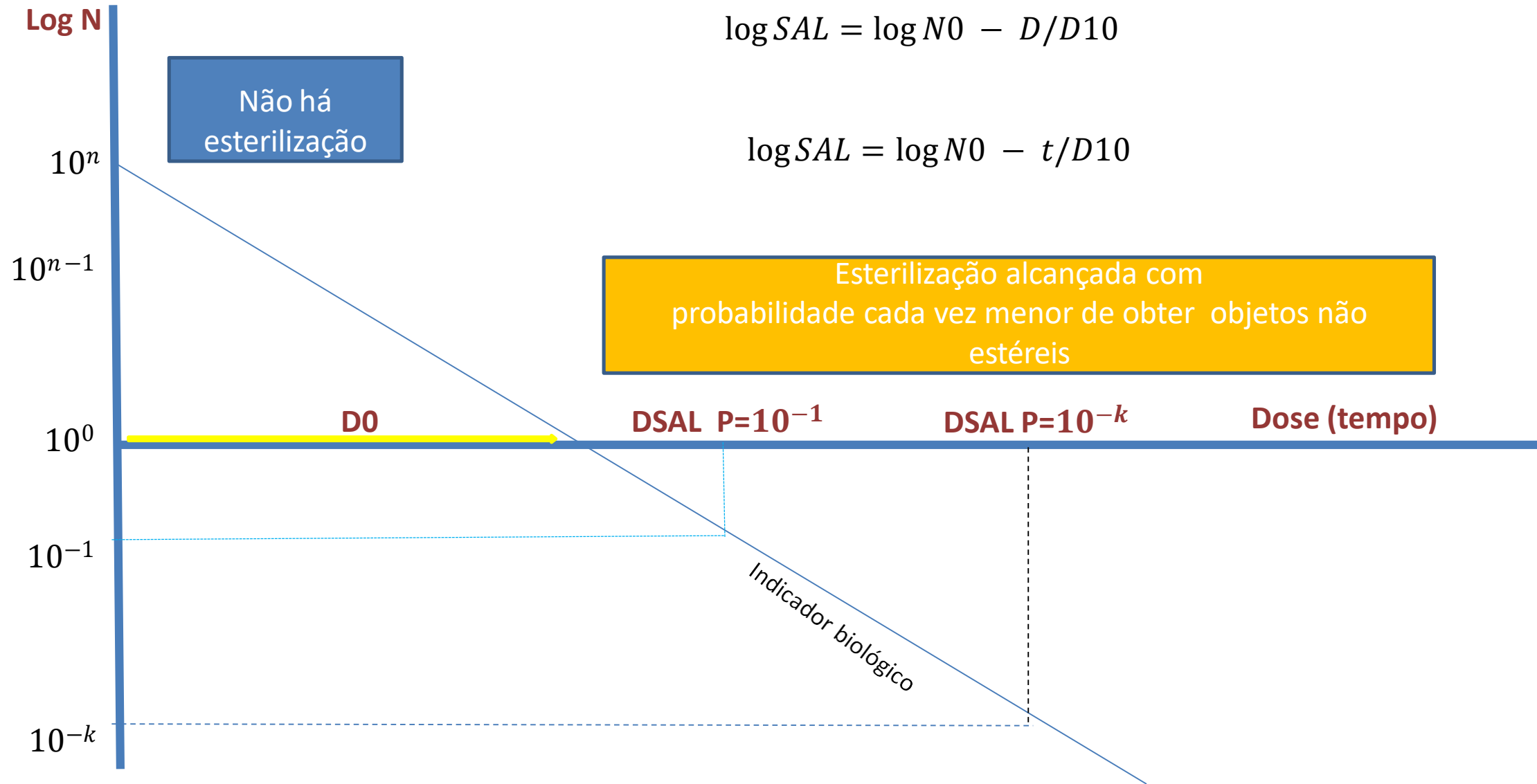
F dose que inclui a probabilidade de contaminação

# Cálculo da probabilidade da não esterilidade dos Microrganismos mais resistentes

$$\log SAL = \log N_0 - KD$$

$$\log SAL = \log N_0 - D/D_{10}$$

$$\log SAL = \log N_0 - t/D_{10}$$



# Nível de segurança de esterilidade

A eficiência de esterilização é expressa como a probabilidade estatística de sobreviverem microrganismos no final do processo

SAL  $10^{-3}$

SAL  $10^{-6}$

Dose SAL – dose de esterilização (inclui probabilidade de contaminação)

$10^{-k}$  (1 em  $10^k$  estar não estéril)

Calcule a probabilidade de não esterilidade dos microrganismos mais resistentes da seguinte situação:

$$N_0 = 10^8$$

Dose – 15 min

D10 – 1,5 min

Num processo industrial de produção de ácido cítrico com fermentadores contendo 500 L de meio de fermentação (melaço de cana e beterraba; nível de contaminação inicial de  $8 \times 10^6$  cfuml<sup>-1</sup>) utilizaram-se dois esquemas de esterilização por calor húmido antes da inoculação da estirpe produtora:

Esquema A – 30 min 121<sup>0</sup> C

Esquema B - 15 s 135<sup>0</sup> C

*Bacillus stearothermophilus*: D10 (121<sup>0</sup> C) = 1,5 min; D10 (135<sup>0</sup> C) = 0,9 s

Considera os dois esquemas equivalentes em termos da margem de segurança associada?  
Justifique a resposta, apresentando todos os cálculos que efectuar.

Uma empresa de importação e distribuição de produtos alimentares que procede à embalagem de especiarias em pacotes de 10 g, pretendendo reduzir o nível de contaminação microbiana habitual neste tipo de produto, solicitou a um laboratório de controlo a determinação da dose de radiação gama a utilizar de modo a garantir um máximo de 100 cfu por pacote.

a) Com base nos dados apresentados na tabela seguinte, determine a dose de radiação (expressa em KGy) necessária para satisfazer o requisito.

	cfu g <sup>-1</sup>	D10 max
bactérias	10 <sup>3</sup>	3 KGy
fungos	10 <sup>4</sup>	2 KGy

b) Discuta a aplicabilidade do conceito de margem de segurança de esterilidade (SAL) a esta situação.

# Desvios da linearidade

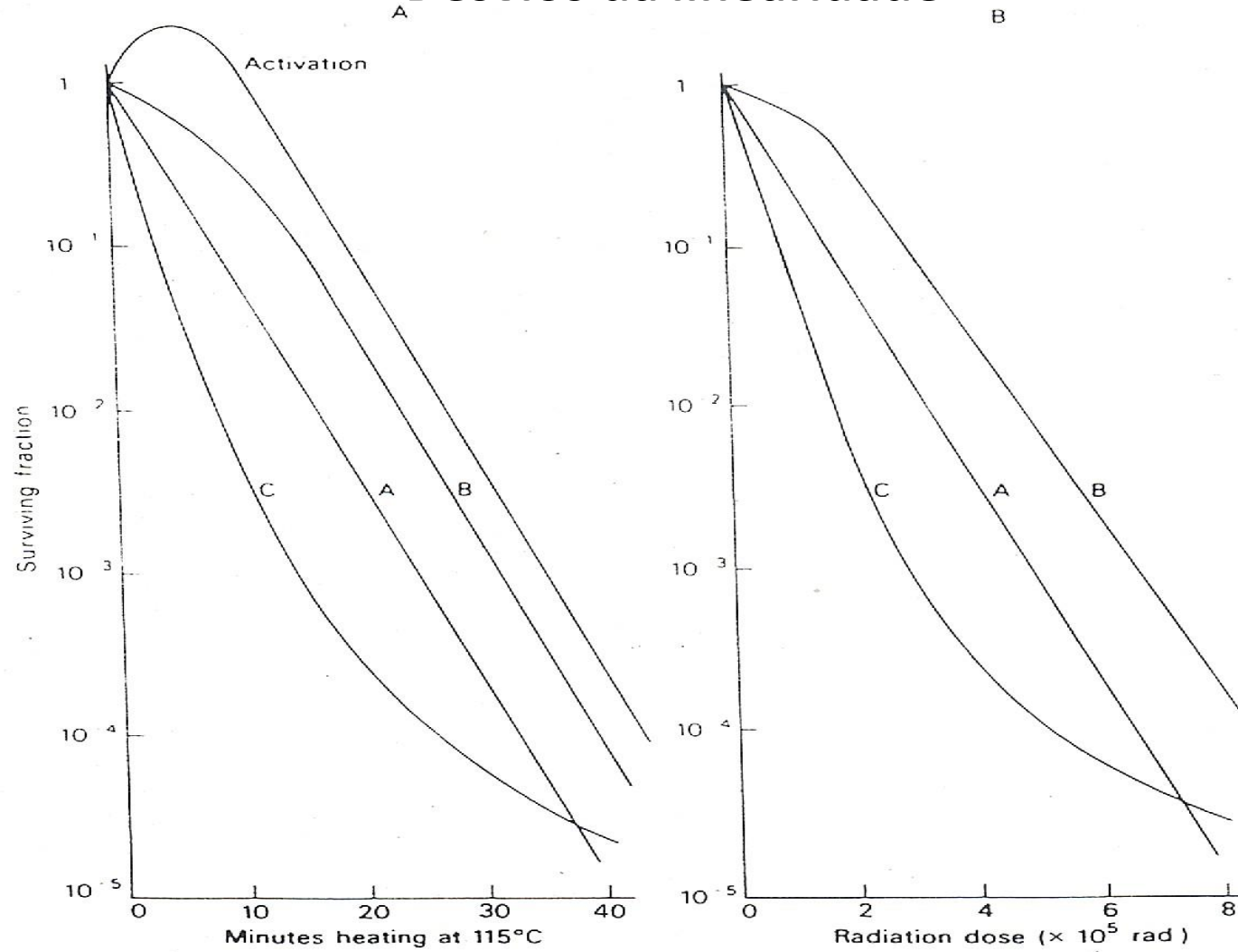
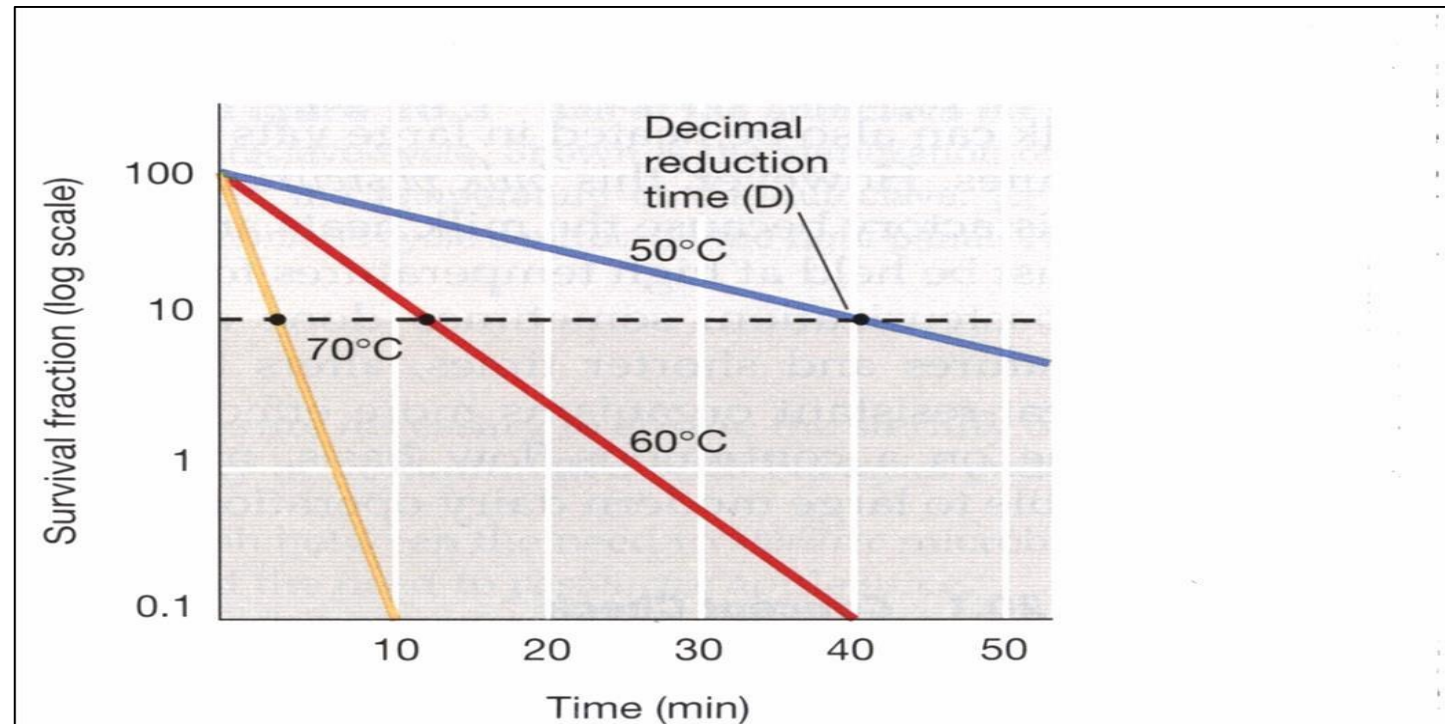


Fig. 19.1 Typical response curves for bacterial spores exposed to (A) moist heat, (B) gamma radiation.

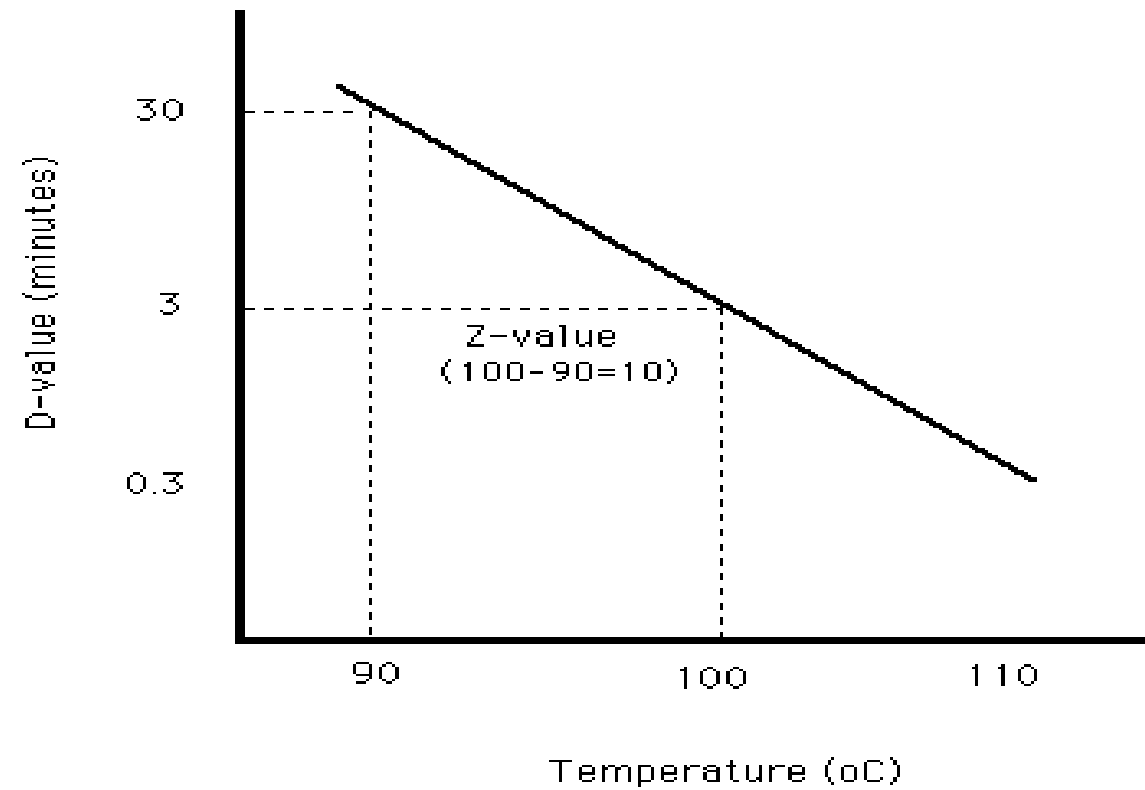
## Efeito da Temperatura no Tempo de Redução Decimal





# Efeito da Temperatura no Tempo de Redução Decimal – Cálculo de doses letais equivalentes

Cálculo do valor z



## **Produção industrial de enzimas**

Fermentação em substrato sólido *versus* fermentação submersa

# FERMENTAÇÃO INDUSTRIAL

## FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO

- Crescimento de m.o num substrato predominantemente insolúvel sem fase líquida livre
- processos mediados por fungos filamentosos

Ex. Produção de *shoyu*, *misu* e *tempé* a partir de feijão de soja por *Aspergillus oryzae*

# FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO

## VANTAGENS

Meios de cultura mais simples e económicos

Redução do processo de esterilização

Maior produtividade

Redução de efluentes

Inoculação directa de esporos

Soluções enzimáticas com concentrações mais elevadas

## DESVANTAGENS

A maioria dos substratos precisa de pré-tratamento

Processo limitado a fungos

Dificuldade de monitorização (determinação de parâmetros mais difícil, dada a não homogeneidade da cultura)

Dificuldade em variar independentemente o pH, a T, transferências de oxigénio/ arejamento

# Fermentação Molho de soja

- São conhecidos 5 tipos principais de molho de soja no Japão
- Usados geralmente como tempero de carnes, produtos marinhos e vegetais
- Resultam da fermentação do feijão de soja e de grão, farinha ou farelo de trigo
- Características comuns:

Quantidades elevadas de sal (17-19%)

pH: 4.6 -4.8

2 – 3.8 g/100 ml de açúcares redutores

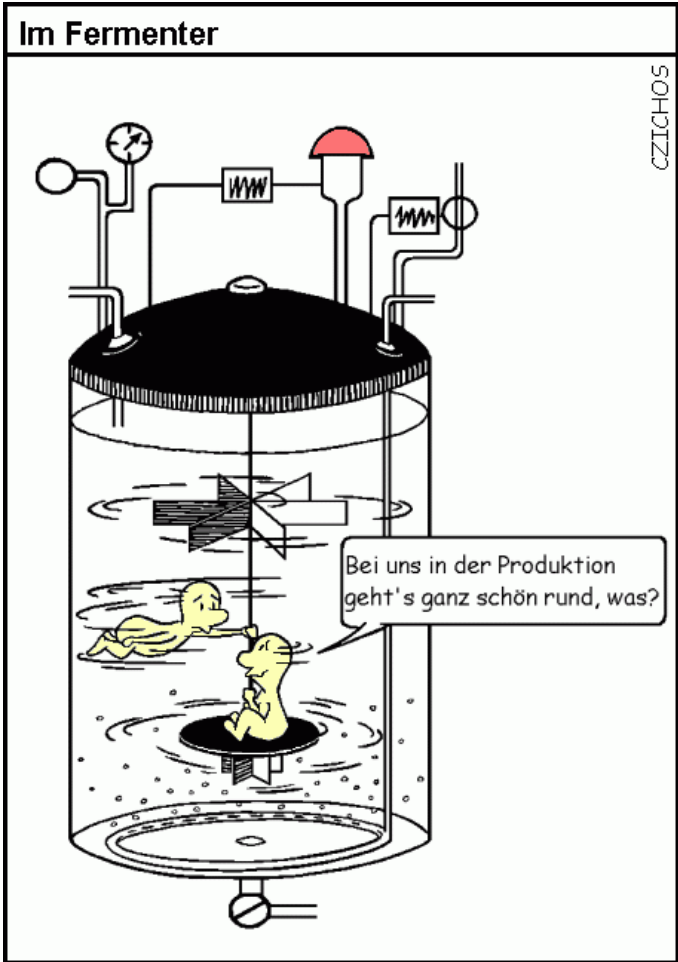
Até 2.2 ml/100 ml de etanol

## Ingredientes

- Feijão de soja ou produtos de soja já semi-processados
- Grão, farinha ou farelo de trigo



# FERMENTAÇÃO SUBMERSA



# PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS

DATA	ENZIMA	TIPO DE FERMENTAÇÃO	MICROORGANISMOS
Antes de 1920	$\alpha$ -amilase	Substrato sólido	<i>Aspergillus oryzae</i>
1920-30	Pectinase $\alpha$ -amilase	Substrato sólido Submersa	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus subtilis</i>
1930-40	Proteinase	Substrato sólido	<i>Aspergillus niger</i>
1940-50	Amiloglucosidase	Substrato sólido	<i>Aspergillus niger</i>
1950-60	$\alpha$ -amilase Glucoseoxidase amiloglucosidase	Submersa Submersa Submersa	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i>
1960-70	Proteinase $\beta$ -galactosidase	Submersa Substrato sólido	<i>Bacillus spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i>
1970-	Glucose isomerase pululanase	Submersa Submersa	Várias fontes <i>Klebsiella aerogenes</i>

ENZIMA	PRODUTO INDUSTRIAL	TIPO DE FERMENTAÇÃO
Proteinases	Detergentes, alimentos, curtumes, queijo	Submersa, enzima extracelular obtida no sobrenadante
Amilases	Amido, cerveja Detergentes e textéis	Submersa, enzima extracelular obtida no sobrenadante
$\beta$ Galactosidase	Derivados do leite	Submersa, enzima na biomassa;
Invertase	confeitaria	Submersa, enzima na biomassa;
Celulase	Alimentos, sumos de fruta	Submersa, enzima extracelular obtida no sobrenadante
Lipases	Alimentos, diagnóstico, detergentes	Submersa, enzima extracelular obtida no sobrenadante
Penicilina acilase	antibióticos	Enzima intracelular



# FERMENTAÇÃO SUBMERSA

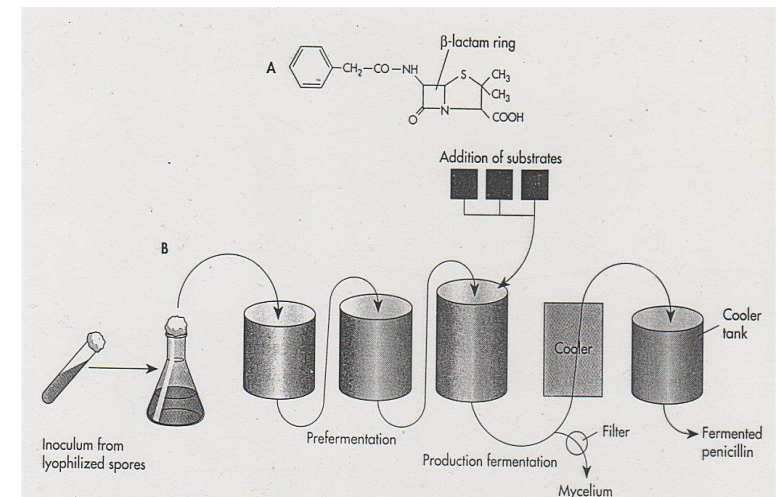
O crescimento é feito em meio líquido com os nutrientes dissolvidos, embora estes possam encontrar-se em suspensão como partículas sólidas

Envolve três etapas:

- Manutenção da estirpe microbiana
- Desenvolvimento de inóculo (3-10% volume meio do fermentador)
- Fermentação

Soluciona muitas das limitações da fermentação em substrato sólido

- Monitorização mais fácil e rigorosa
- Esterilização do meio de cultura é eficiente
- Permite o crescimento de bactérias



## Escalas de BIOREACTORES

“**Lab scale**”- escala de laboratório:

- Balão erlenmeyer 1-10 L (descontínuo, fechadas, batch).
- Quimiostato turbidostato

“**Pilot plant**”- escala intermédia- fermentadores pequenos e intermédios (300-3000 L)

“**Large scale**”- produção comercial (10 a 500 m<sup>3</sup>)

# Arejamento e agitação de Bioreatores

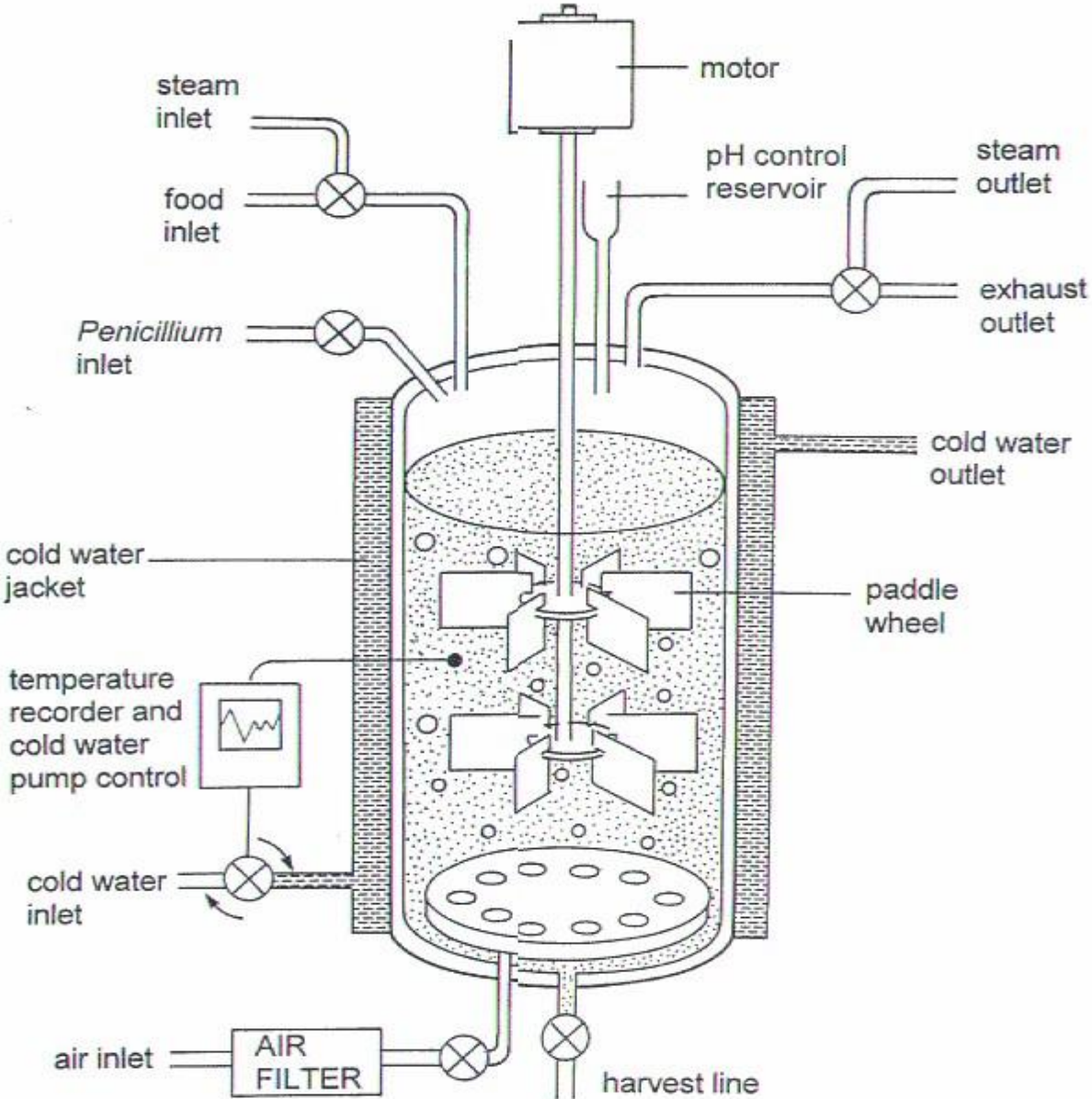
**“Stirred-tank” reactor**- com agitação mecânica

**Bubble column**- bolhas de ar que atravessam o meio de fermentação

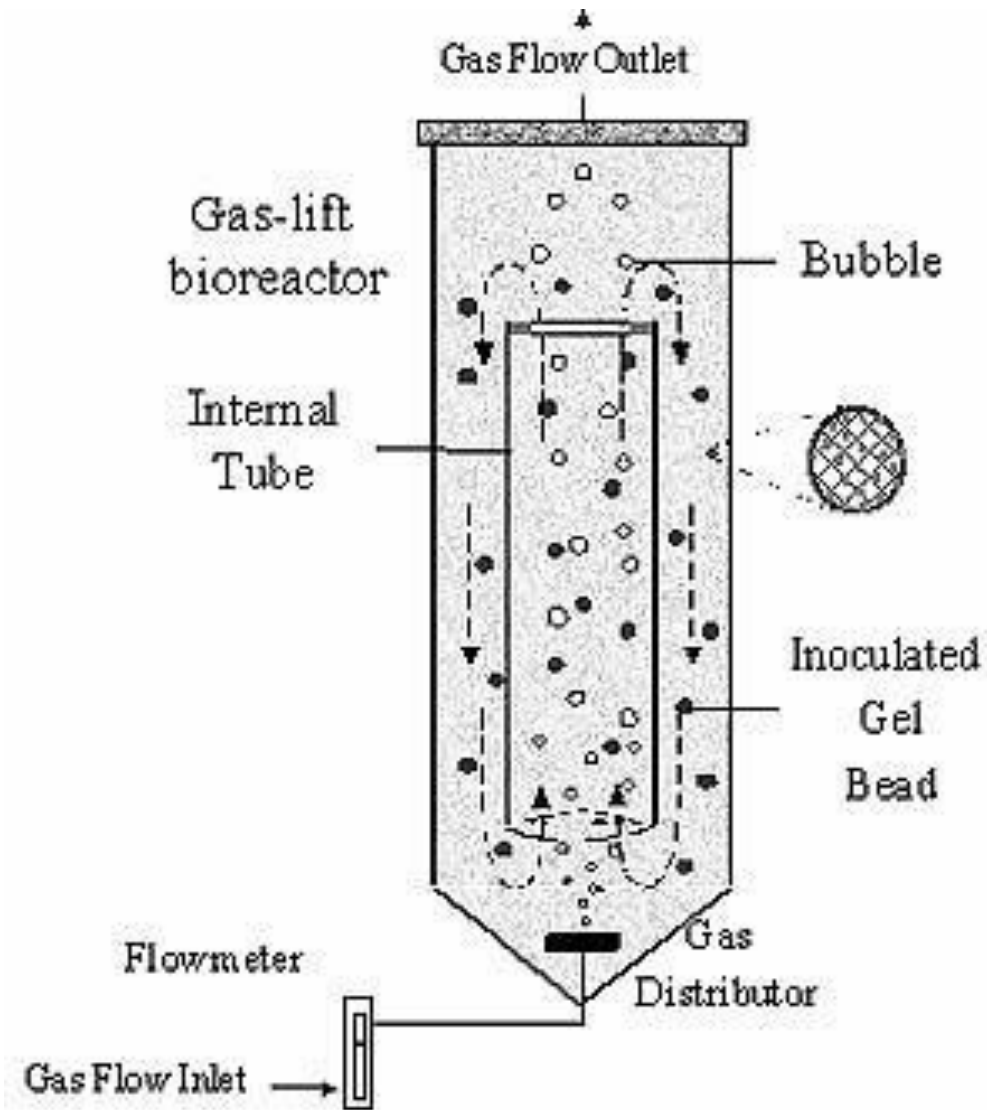
**“Airlift”**- elevador com corrente ascendente de ar e meio e descendente de meio

**“Packed bed”**- matriz sólida com microrganismos imobilizados

# REACTOR PERFEITAMENTE AGITADO E AREJADO

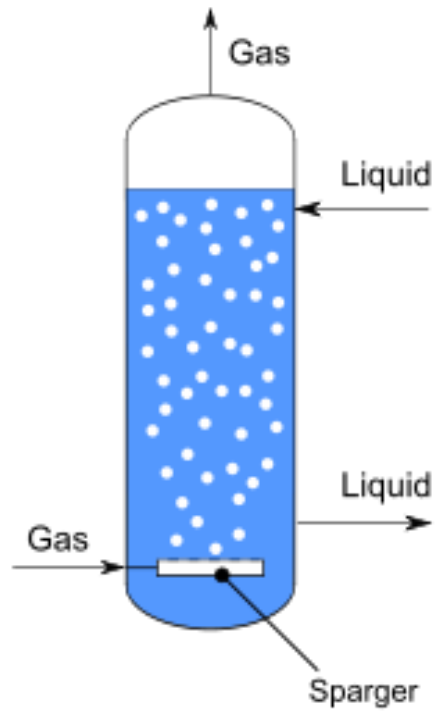


**REACTOR DO TIPO  
AIR-LIFT**

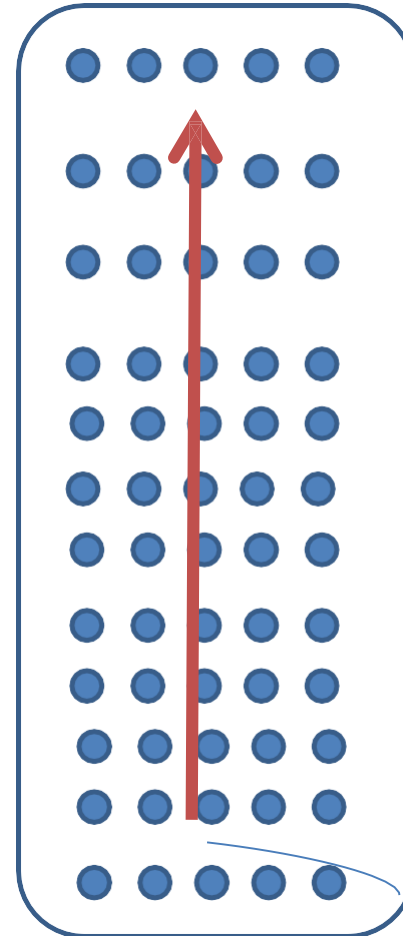


**“Airlift”**- elevador com corrente ascendente de ar e meio e descendente de meio

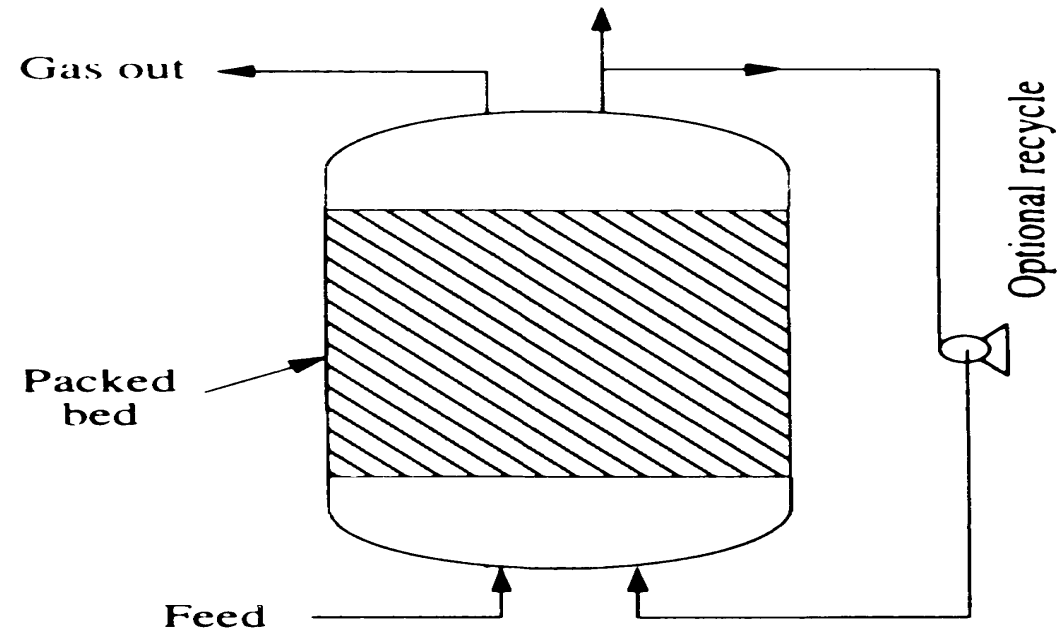
**REACTOR DO TIPO  
BUBBLE COLUMN**



“Bubble column- bolhas de ar que atravessam o meio de fermentação



**“Packed bed”- matriz sólida com microrganismos imobilizados**



**(a)**